

P. 6118

ISSN 0753-4973

# ALYTES

INTERNATIONAL JOURNAL OF BATRACHOLOGY



January 2001

Volume 18, N° 3-4

- 2 FEV. 2001

Source : MNHN, Paris



**International Society for the Study  
and Conservation of Amphibians**  
(International Society of Batrachology)

SEAT

Laboratoire des Reptiles et Amphibiens, Muséum national d'Histoire naturelle, 25 rue Cuvier, 75005 Paris, France. - Tel.: (33).(0)1.40.79.34.87. - Fax: (33).(0)1.40.79.34.88. - E-mail: dubois@mnhn.fr.

BOARD

*President:* W. Ronald HEYER (Washington, USA).  
*General Secretary:* Alain DUBOIS (Paris, France).  
*Deputy Secretary:* Annemarie OHLER (Paris, France).  
*Treasurer:* Jean-Louis DENIAUD (Paris, France).  
*Deputy treasurer:* Rafael DE SA (Paris, France).  
*Councillors:* Britta GRILLITSCH (Wien, Austria); C. Kenneth DODD, Jr. (Gainesville, USA); Julio Mario HOYOS (Bogotá, Colombia); Thierry LODÉ (Angers, France); Jon LOMAN (Lund, Sweden); Alain PAGANO (Angers, France); Stephen J. RICHARDS (Townsville, Australia).

TARIFF FOR 2000

INDIVIDUALS

Regular 2000 subscription to <i>Alytes</i> (volume 18) + ISSCA + <i>Circalytes</i>	300 FF / 60 \$
Student 2000 subscription to <i>Alytes</i> (volume 18) + ISSCA + <i>Circalytes</i>	150 FF / 30 \$
<b>SPECIAL OFFER: gift half-price subscription of one year for a colleague of your choice:</b>	<b>Half of price above</b>
Regular 2000 subscription to <i>Alytes</i> (volume 18) alone	280 FF / 56 \$
Student 2000 subscription to <i>Alytes</i> (volume 18) alone	140 FF / 28 \$
Back issues of <i>Alytes</i> : any single issue	70 FF / 14 \$
Back issues of <i>Alytes</i> : any complete volume (4 issues)	225 FF / 45 \$
Back issues of <i>Alytes</i> : complete set of volumes 1 to 17 (1982-2000)	3060 FF / 612 \$
Regular five-year (2000-2004, volumes 18 to 22) individual subscription to <i>Alytes</i>	1120 FF / 224 \$
Regular five-year (2000-2004, volumes 18 to 22) individual subscription to <i>Alytes</i> + ISSCA + <i>Circalytes</i>	1500 FF / 300 \$
<b>SPECIAL OFFER: five-year (2000-2004, volumes 18 to 22) individual subscription to <i>Alytes</i> + ISSCA + <i>Circalytes</i>, with complete set of back issues of <i>Alytes</i> (1982-2000, volumes 1 to 17)</b>	<b>3500 FF / 700 \$</b>
Life individual subscription to <i>Alytes</i> from 2000 on	5600 FF / 1120 \$
Life individual subscription to <i>Alytes</i> + ISSCA + <i>Circalytes</i> from 2000 on	7000 FF / 1400 \$
Patron individual subscription to <i>Alytes</i> from 2000 on	11200 FF / 2240 \$ or more
Patron individual subscription to <i>Alytes</i> + ISSCA + <i>Circalytes</i> from 2000 on:	14000 FF / 2800 \$ or more

**Important notice: from 1996 on, any new life or patron individual subscriber to *Alytes* is offered a free complete collection of back issues of *Alytes* from the first issue (February 1982) until the start of her/his subscription.**

INSTITUTIONS

2000 subscription to <i>Alytes</i> (volume 18) alone	560 FF / 112 \$
2000 subscription to <i>Alytes</i> (volume 18) + ISSCA + <i>Circalytes</i>	600 FF / 120 \$
Back issues of <i>Alytes</i> : any single issue	140 FF / 28 \$
Back issues of <i>Alytes</i> : any complete volume (4 issues)	450 FF / 90 \$
Back issues of <i>Alytes</i> : complete set volumes 1 to 17	6120 FF / 1224 \$
<b>SPECIAL OFFER: five-year (2000-2004, volumes 18 to 22) subscription to <i>Alytes</i> + ISSCA + <i>Circalytes</i>, with complete set of back issues of <i>Alytes</i> (1982-2000, volumes 1 to 17)</b>	<b>3500 FF / 700 \$</b>

*Circalytes* is the internal information bulletin of ISSCA. Back issues of this bulletin are also available: prices can be provided upon request by our Secretariat.

MODES OF PAYMENT

- In French Francs, by cheques drawn on a French bank payable to "ISSCA", sent to our secretariat (address above).

- In French Francs, by direct postal transfer to our postal account: "ISSCA", Nr. 1-398-91 L, Paris; **if you use this mode of payment, add 15 FF to your payment for postal charges at our end.**

- In US Dollars, by cheques payable to "ISSCA", sent to Rafael O. DE SA, Associate Professor, Department of Biology, University of Richmond, Richmond, VA 23173, USA (e-mail: rdesa@richmond.edu; fax: (804) 289-8233).

# ALYTES

INTERNATIONAL JOURNAL OF BATRACHOLOGY

January 2001

Volume 18, N° 3-4

*Alytes*, 2001, 18 (3-4): 97-126.

Review paper

## Quatre décennies d'expérimentation embryologique chez les Amphibiens Urodèles

Charles HOUILLON

179 boulevard Voltaire,  
75011 Paris, France

Manipulations of embryonic stages have been realised in species of salamanders (Amphibia, Urodela): the newts *Pleurodeles waltl* (Michahelles, 1830), *Pleurodeles poireti* (Gervais, 1835), *Triturus alpestris* (Laurenti, 1768), *Triturus helveticus* (Razoumowsky, 1789), *Triturus vulgaris* (Linné, 1758) and *Triturus cristatus* (Laurenti, 1768), and the axolotl, *Ambystoma mexicanum* (Shaw, 1789).

Tolerance or rejection of implants of embryonic tissues, such as skin grafts, depends on the degree of histocompatibility between the seven species. The axolotl acts as a "universal donor" for the other newts. The tolerance of presumptive gonadal primordia results in the emission of eggs of one species by another species.

The survival of heterospecific parabiotic pairs confirms the relative histocompatibility observed with skin grafts. The metamorphosis of axolotl forming a parabiosis with a *Triturus* species is caused by thyroid hypersecretion of the newt.

Of the 49 combinations forming potentially possible chimeras between embryos of the seven species, 4 allogenic combinations (chimeras between embryos of the same species) have actually been successfully realised (over 570 chimeras reaching from 4 months to 15 years of age), as well as 23 xenogenic combinations (chimeras of embryos of different species) (536 chimeras reaching from 3 months to 7 years of age). The allogenic chimeras are viable at the same level as normal animals. Chimera constructs of double body have two pairs of gonads. In homosexual combinations, the animals have either 4 functional ovaries or 4 functional testes (germinal chimeras). In heterosexual combinations, the interactions between gonads of different sexes depend on their relative position: free-martin effect (inhibition and even inversion of ovaries) is observed when the ovaries are anterior relative to testes. This effect is weak and often even absent when the ovaries are posterior relative to testes. In this case the development of posterior ovaries is scarcely modified by the anterior testes.

The survival of xenogenic chimeras depends on the species combination and on the direction of the association. A xenogenic chimera that reaches



the adult stage can show the sexual behaviour of the species that forms its anterior part and of the species that forms its posterior part.

Salamanders, showing only exceptionally spontaneous tumours, develop teratomas after implantation of embryos, allogenic or xenogenic, in the coelomic cavity of young larvae. Some of these experimental tumours remain benign, but others destabilise, becoming teratocarcinomas.

Ovaries taken from juvenile animals and transplanted into young animals, either castrated males or castrated females, can be indefinitely tolerated, even if they form xenotransplants.

The tolerance of axolotl ovaries by *Pleurodeles* allows the systematic emission of axolotl eggs by *Pleurodeles*. After artificial fertilisation, the eggs, which have completed their entire growth in a foreign organism, show an apparently normal development.

The relative histocompatibility of embryonic xenografts, the survival of parabiotic pairs and xenogenic chimeras, the free-martin effect of position in interactions between gonads, the formation and destabilisation of experimental teratomas are phenomena that remain unexplained.

The anatomical specimens arising from the described experiments are classified and stored in the collection of the Laboratoire des Reptiles et Amphibiens of the Muséum national d'Histoire naturelle, Paris.

## SOMMAIRE

Abstract .....	97
Introduction .....	99
Matériel et méthodes .....	99
Greffes de téguments embryonnaires et d'ébauches présomptives .....	101
Allogreffes .....	101
Xéno-greffes .....	102
Parabioses .....	105
Allogéniques .....	105
Xéno-géniques .....	106
Chimères .....	108
Allogéniques .....	110
Xéno-géniques .....	111
Tératomes et tératocarcinomes expérimentaux .....	113
Allogéniques .....	115
Xéno-géniques .....	115
Transplantations ovariennes .....	118
Allogéniques .....	119
Xéno-géniques .....	119
Autres interventions embryonnaires .....	120
Organogenèse de la gonade .....	120
Formation du canal de Müller .....	121
Inversion du phénotype sexuel femelle par la température .....	121

Clonage du pleurodèle à partir du noyau des cellules germinales .....	121
Expérience "FERTILE" .....	122
Conclusions .....	122
Résumé .....	123
Remerciements .....	124
Références bibliographiques .....	125

## INTRODUCTION

L'embryologie descriptive prit son essor à la suite des idées évolutionnistes à partir du dernier tiers du 19<sup>e</sup> siècle. Elle fut aussitôt suivie par l'embryologie expérimentale, aussi appelée embryologie causale, dès la fin du même siècle. A ce propos, il est bon de rappeler CHABRY (1887), qui imagina le micromanipulateur pour détruire l'un des deux premiers blastomères de l'oeuf d'ascidie. Peu après, DRIESCH (1891) réussit à séparer les deux premiers blastomères de l'oeuf d'oursin. Mais, dès cette époque, l'oeuf d'amphibien s'imposa comme matériel particulièrement favorable pour les mêmes interventions précoces grâce à ROUX (1895) et l'école allemande. Faisant preuve de beaucoup d'audace pour l'époque, BORN (1897) tenta d'associer des héli-embryons afin de fabriquer des germes composites qui survécurent quelques semaines. Puis SPEMANN, par des manipulations encore plus fines sur l'oeuf de triton à propos de l'organogenèse de l'oeil (1901) et surtout avec la greffe de la lèvre dorsale du blastopore (1921), donna ses lettres de noblesse à l'embryologie expérimentale.

La faveur pour cette discipline ne s'est jamais démentie durant tout le 20<sup>e</sup> siècle. C'est ainsi que BRIGGS & KING (1952) avec *Rana catesbeiana* furent les pionniers de la transplantation nucléaire. On oublie trop souvent que les premiers vertébrés clonés furent des amphibiens tant anoures qu'urodèles, il y a plus de 40 ans! A partir des années 1960, l'oeuf des mammifères trouva sa place de choix dans la discipline avec les souris tétraparentales de TARKOWSKI (1961) et de MINTZ (1962). Est-il besoin de rappeler la remarquable actualité de la greffe nucléaire qui vient d'être adaptée à l'oeuf de mammifère? Le clonage avec ses problèmes de toutes natures garantit de belles perspectives pour l'embryologie à l'aube du 21<sup>e</sup> siècle.

Le propos de la présente revue concerne des greffes embryonnaires les plus diverses réalisées chez les amphibiens urodèles, avec comme originalité d'être pratiquées entre espèces différentes. De telles greffes sont encore irréalisables chez les mammifères.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'intérêt des amphibiens pour la microchirurgie embryonnaire tient à un ensemble d'avantages exceptionnels chez les vertébrés: (1) oeufs pondus en abondance (quelques dizaines pour les tritons, quelques centaines pour le pleurodèle et l'axolotl); (2) oeufs obtenus souvent en toutes saisons par injections hormonales (hormones gonadotropes ou mieux



encore, facteurs hypothalamiques); (3) oeufs relativement volumineux dont le diamètre est compris entre un et deux millimètres alors que l'oeuf de mammifère ne dépasse guère un dixième de millimètre; (4) possibilité de fécondation artificielle; (5) facilité d'accès à l'oeuf ou à l'embryon après dégantage; (6) développement en milieu externe d'où commodité d'une observation continue; (7) développement assez lent qui peut être légèrement ralenti ou accéléré en fonction de la température; (8) élevage facile une fois maîtrisés les paramètres relatifs à la nourriture et à la qualité de l'eau; (9) élevage des animaux expérimentaux jusqu'à l'état adulte ce qui permet d'envisager leur reproduction; toutefois, celle-ci n'est le plus souvent réalisable que vers l'âge de deux ans.

Les interventions sur les embryons ou les animaux juvéniles rapportées dans cet article ont été, pour la plupart, effectuées par l'auteur dans le laboratoire de Biologie Animale-Embryologie de l'Université Pierre et Marie Curie. Elles ont concerné sept espèces d'amphibiens urodèles dont six pour la famille des Salamandridae Goldfuss, 1820 (*Pleurodeles* et *Triturus*) et une pour la famille des Ambystomatidae Gray, 1850 (axolotl): *Pleurodeles waltl* (Michahelles, 1830), pleurodèle de Waltl (P.w.); *Pleurodeles poireti* (Gervais, 1835), pleurodèle de Poiret (P.p.); *Triturus alpestris* (Laurenti, 1768), triton alpestre (alp.); *Triturus helveticus* (Razoumowsky, 1789), triton palmé (palm.); *Triturus vulgaris* (Linné, 1758), triton commun (vulg.); *Triturus cristatus* (Laurenti, 1768), triton crêté (cr.); *Ambystoma mexicanum* (Shaw, 1789), axolotl (Ax.).

Avec l'axolotl on dispose de plusieurs souches dont la pigmentation dépend de deux couples de gènes alléomorphes, utilisables comme marqueurs pigmentaires pour suivre l'évolution des greffes (LESIMPLE et al., 1990):

- (1) souche "sauvage" (DA/DA): oeufs, embryons, larves et adultes pigmentés;
- (2) souche "blanche" (dA/dA): oeufs et embryons pigmentés, larves et adultes dépigmentés par suite de l'absence de migration et du non-étalement des cellules pigmentaires, en particulier des mélanophores;
- (3) souche "albinos sauvage" (Da/Da): oeufs et embryons albinos, larves et adultes jaunâtres par suite de la présence de xanthophores et d'iridophores mais absence de mélanophores (pas de synthèse de mélanine);
- (4) souche "albinos blanche" (da/da): oeufs, embryons, larves et adultes dépigmentés.

La terminologie employée est celle propre aux greffes en immunologie: les allogreffes ou greffes allogéniques sont des interventions entre individus de la même espèce et les xénogreffes ou greffes xénogéniques sont des interventions entre individus d'espèces différentes. Par exemple, le terme "allogénique" sera employé pour des interventions entre embryons d'axolotl même s'ils sont de souches différentes et le terme "xénogénique" sera employé pour des interventions entre embryons d'axolotl et embryons de tritons.

Les différentes souches d'axolotl et les deux espèces de pleurodèles sont élevées en permanence au laboratoire. En revanche, les différentes espèces de tritons proviennent directement de la nature où elles sont récoltées au printemps; ces animaux sont remis dans leurs mares d'origine quelques mois plus tard, après avoir servi de progéniteurs.

La technique opératoire sera précisée à propos de chaque type d'intervention. La méthode générale relève de la microchirurgie embryonnaire classiquement appliquée aux

amphibiens. Le maximum d'asepsie est requis en particulier la stérilisation des milieux physiologiques opératoires (milieu de Holtfreter et milieu de Steinberg). Les interventions se font dans des coupelles opératoires sur fond de gélose ou plus commodément sur fond de pâte à modeler et en utilisant une loupe binoculaire aux grossissements 10, le plus souvent 16, mais rarement davantage. Les instruments destinés aux interventions sur les embryons sont de simples fils de platine (diamètre 3 ou 4 centièmes de millimètre) emmanchés sur des tubes de verre.

Les interventions sur les embryons se pratiquent au stade du bourgeon caudal, avant la réponse musculaire, les germes étant âgés de 4 à 5 jours selon les espèces et la température ambiante. Seuls sont gardés les embryons parfaitement cicatrisés 24 heures après l'opération. Ils séjournent ensuite pendant 3 à 5 jours dans le milieu d'élevage (liquide opératoire dilué au 1/10 dans l'eau ordinaire). Après quoi, ils peuvent être mis définitivement dans l'eau ordinaire car ils atteignent pratiquement le stade de l'éclosion tout comme s'ils étaient demeurés dans les conditions naturelles. La première alimentation intervient environ 8 jours plus tard.

Dans la plupart des cas, l'analyse ne porte que sur les animaux expérimentaux qui survivent au moins jusqu'à l'âge de trois mois, ce qui correspond le plus souvent à l'époque de la métamorphose. L'élevage se poursuit le plus longtemps possible, au moins jusqu'à l'état adulte mais parfois pendant plus de dix années.

La pratique de la microchirurgie embryonnaire des amphibiens ne demande guère d'aptitudes particulières si ce n'est une certaine dextérité, beaucoup de persévérance pour refaire maintes fois le même type d'expérience et surtout une grande disponibilité afin de pouvoir utiliser en temps utile des embryons appartenant à des espèces différentes et aux stades opératoires convenables. Il est nécessaire de bien connaître les conditions de reproduction des progéniteurs lorsqu'on désire disposer d'une ponte de pleurodèle en même temps que d'une ponte d'axolotl ou de triton, ou encore disposer simultanément de plusieurs pontes d'axolotl provenant de souches différentes. La connaissance de la chronologie du développement de chaque espèce est indispensable. Dans l'exposé ci-dessous, le mot "pleurodèle", utilisé seul, se rapporte à *Pleurodeles waltl*, espèce la plus fréquemment utilisée dans nos expériences.

## GREFFES DE TÉGUMENTS EMBRYONNAIRES ET D'ÉBAUCHES PRÉSOMPTIVES

### ALLOGREFFES

L'intervention la plus banale consiste à prélever un lambeau de tégument sur un embryon pour le greffer sur un autre embryon après avoir éliminé le territoire équivalent. Il s'agit d'une allogreffe qui peut être réalisée entre un embryon d'axolotl de la souche albinos (embryon donneur dépigmenté) et un embryon de la souche blanche (embryon receveur pigmenté) (fig. 1). Par la suite, l'embryon receveur évolue en larve puis en adulte "blanc" car les mélanophores bien que présents ne migrent pas et ne s'étalent pas. En revanche, le greffon "albinos", qui originellement ne possédait pas de mélanophores, va se pigmenter intensément car, possédant un substrat convenable, il attire les mélanophores de l'hôte qui peuvent s'étaler :

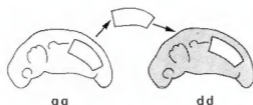


Fig. 1. – Allogreffe de tégument et d'ébauche gonadique présomptive entre un embryon d'axolotl de la souche albinos (aa) et un embryon de la souche blanche (dd) (voir *Matériel et méthodes* pour la définition de ces souches).

un greffon "albinos" sur un hôte "blanc" devient très rapidement noirâtre (fig. 4). Et pourtant le greffon garde bien sa structure albinos originelle! En effet, en même temps que le tégument, on peut greffer la partie sous-jacente qui correspond à l'ébauche présomptive de la gonade. Si on se trouve dans le cas particulier, réalisé une fois sur quatre, d'une ébauche présomptive ovarienne "albinos" greffée sur un embryon femelle "blanc", l'ébauche greffée évolue en ovaire tout comme la gonade de l'hôte située du côté non-opéré. Cet axolotl femelle blanc possède un ovaire avec des ovocytes pigmentés du côté non-opéré et un ovaire avec des ovocytes albinos du côté opéré. Finalement un tel animal peut pondre, en même temps que ses propres oeufs pigmentés, des oeufs dépigmentés provenant de la greffe ovarienne (fig. 5) (HOUILLOIN & BAGNARA, 1996).

Une sorte de contre-épreuve de l'expérience ci-dessus est apportée par l'allogreffe de crête neurale dont sont issues les cellules pigmentaires. Un fragment de crête neurale prélevé sur une neurula de la souche blanche peut être greffé à l'emplacement équivalent d'une neurula de la souche albinos (fig. 2). L'embryon hôte évolue normalement en larve puis en adulte albinos mais, peu avant le stade de l'éclosion, on observe l'apparition de mélanophores au voisinage puis ultérieurement assez loin de la greffe. L'hôte albinos se trouve plus ou moins localement pigmenté par les mélanophores issus du greffon blanc qui trouvent dans cet hôte le substrat nécessaire à leur migration et à leur étalement. Ainsi, un axolotl albinos peut être partiellement pigmenté par une allogreffe de crête neurale de la souche blanche (fig. 6). Des phénomènes migratoires comparables s'observeront chez les chimères allogéniques entre les axolotls de la souche blanche et les axolotls de la souche albinos.

#### XÉNOGREFFES

Les xénogreffes de téguments embryonnaires sont réalisables selon le même protocole que les allogreffes entre le pleurodèle, l'axolotl et les tritons (fig. 3). L'hôte poursuit son développement normal et le greffon se différencie conformément à son origine, mais son évolution à plus long terme dépend du sens de la greffe.

Le cas le plus remarquable, encore inexpliqué, est la tolérance parfaite et indéfinie des xénogreffes embryonnaires d'axolotl aussi bien sur le pleurodèle (fig. 7) que sur les diverses espèces de tritons. A l'inverse, les xénogreffes embryonnaires de pleurodèle aussi bien que de



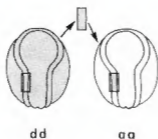


Fig. 2. – Allogreffe de crête neurale d'une neurula d'axolotl de la souche blanche (dd) sur une neurula de la souche albinos (aa).

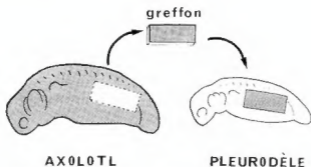
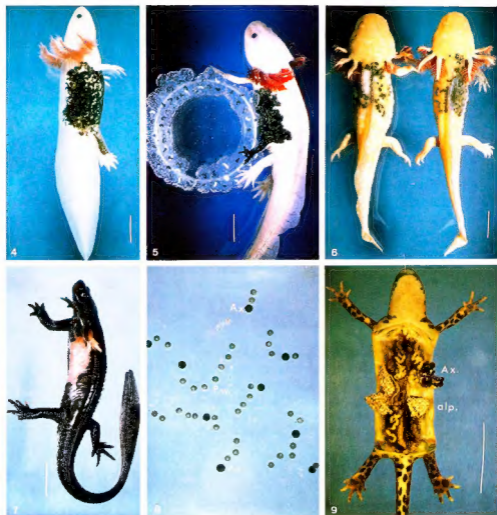


Fig. 3. – Xénogreffe de tégument et d'ébauche gonadique présomptive entre un embryon d'axolotl et un embryon de pleurodèle.

tritons sont inéluctablement rejetées par l'axolotl après une tolérance de quelques mois. Le rejet des xénogreffes embryonnaires par l'axolotl peut intervenir brutalement en quelques jours, entraînant la mort de l'hôte. Dans les autres cas, surtout entre le pleurodèle et les tritons, le rejet intervient plus ou moins lentement, permettant aux téguments rejetés d'être progressivement remplacés par les téguments de l'hôte.

Il découle de cette étude la notion d'"histocompatibilité relative" entre les différentes espèces d'urodèles, qui va en décroissant dans le sens axolotl, triton palmé, triton alpestre, pleurodèle (HOULLON, 1967; HOULLON et al. 1969). L'axolotl peut être considéré comme "donneur universel" pour les xénogreffes embryonnaires, mais il ne tolère que les allogreffes embryonnaires, c'est-à-dire de sa propre espèce.

La tolérance pour les xénogreffes de téguments embryonnaires se retrouve pour les xénogreffes d'ébauches présomptives. Ainsi, en même temps que les téguments d'axolotl, on peut prélever l'ébauche présomptive sous-jacente de la gonade (HOULLON, 1973). Dans le cas particulier où il s'agit d'une ébauche ovarienne greffée sur un embryon femelle de pleurodèle ou de triton, cette ébauche se différencie en ovaire tout comme la gonade de l'hôte située du



Greffes de téguments embryonnaires et d'ébauches gonadiques présomptives.  
Barre = 20 mm.

Fig. 4. – Greffe allogénique de tégument embryonnaire d'axolotl "albinos" sur un axolotl "blanc". Les mélanophores de l'hôte "blanc", qui ne migrent pas et ne s'étalent pas, sont "attirés" dans le greffon "albinos" où ils peuvent s'étaler (12 mois, 190 mm).

côté non-opéré. On obtient un pleurodèle ou un triton femelle qui possède un ovaire normal du côté non-opéré et un ovaire d'axolotl du côté opéré (fig. 9). Le pleurodèle pondra en même temps ses propres oeufs et des oeufs d'axolotl (fig. 8), mais les oeufs d'axolotl sont trop gros pour être pondus par un triton.

## PARABIOSES

### ALLOGÉNIQUES

La greffe en parabiose (BURNS, 1925) consiste à souder deux embryons entiers (fig. 10) pour établir une circulation croisée entre deux animaux afin de mimer le phénomène freemartin des Bovides. Lorsqu'une vache donne naissance à deux veaux de sexe différent, par la suite le mâle peut procréer normalement dans la majorité des cas alors que la femelle est le plus souvent stérile. L'interprétation de ce phénomène (LILLIE, 1916) est qu'à la suite d'une fusion placentaire des anastomoses vasculaires s'établissent très précocement, permettant une circulation croisée entre les deux foetus. Or, comme la différenciation sexuelle mâle s'effectue la première, les facteurs responsables de cette différenciation diffusent dans le jumeau femelle, inhibant la différenciation des ovaires et même provoquent leur masculinisation.

La soudure de deux embryons d'amphibiens peut se faire latéralement au niveau des flancs (parabiose proprement dite) (fig. 11-13) ou par les extrémités caudales (telobiose)

Fig 5 Greffe allogénique de tegument et d'ébauche ovarienne présomptive d'axolotl "albinos" sur un axolotl femelle "blanc". L'hôte "blanc" pond des oeufs pigmentés provenant de l'ovaire situé du côté non-opéré et des oeufs dépigmentés provenant du greffon ovarien toléré (12 mois, 190 mm, photographie 8 jours après la ponte)

Fig 6 Allogreffes de crête neurale d'axolotl "blanc" sur des axolotls "albinos". Les melanophores d'axolotl blanc trouvent dans les axolotls "albinos" le substrat nécessaire à leur migration et à leur étallement. Le greffon "blanc", non pigmenté, est bien visible sur l'animal de gauche, légèrement en arrière de la tête et à gauche (2 ans, 190 mm). Un axolotl "albinos" peut être pigmenté par une greffe d'axolotl "blanc".

Fig 7 Greffe xenogénique de tegument d'axolotl blanc sur le pleurodèle. Tolerance indéfinie des xenogreffes embryonnaires d'axolotl sur le pleurodèle (4 ans, 180 mm)

Fig 8 Ponte simultanée d'oeufs de pleurodèle (Pw), les plus nombreux et les plus clairs (1-4 mm) et d'oeufs d'axolotl (Ax), les plus gros et les plus foncés (1-8 mm) par un pleurodèle femelle qui a toléré une ébauche ovarienne présomptive d'axolotl.

Fig 9 Dissection d'un triton alpestre femelle qui avait reçu une xenogreffe embryonnaire d'ébauche ovarienne présomptive d'axolotl indéfiniment tolérée. Du côté droit non-opéré ovaire de triton alpestre à maturité sexuelle. Du côté gauche greffe, ovaire d'axolotl (Ax) à maturité sexuelle ainsi qu'un élément ovarien postérieur de triton alpestre (alp). Les ovocytes d'axolotl sont trop volumineux pour pouvoir transiter dans les oviductes de triton alpestre (7 ans, 100 mm)

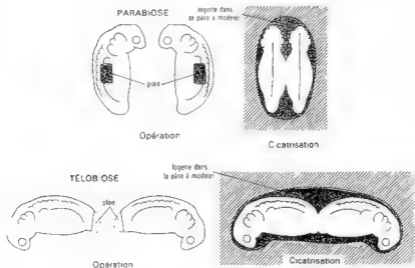


Fig 10 – Principe de la greffe en parabiose entre deux embryons de pleurodele.

(fig 14-15). La parabiose allogénique, plus communément appelée parabiose homospécifique, est assez facilement réalisable chez le pleurodele, l'axolotl et le triton alpestre. Les paires parabiontiques ont un développement normal: certaines parabioses pleurodele/pleurodele ont survécu plus de six ans. Cependant des anastomoses digestives dues à une soudure trop intime des deux parabiontes abrègent souvent la survie.

#### XÉNOGÉNIQUES

La survie des parabioses xenogéniques est nettement plus brève que celle des parabioses allogéniques et dépend des espèces associées. Le maximum observé a été de trois ans pour

#### Parabioses allogéniques.

Barre = 20 mm, sauf pour la fig. 11

Fig 11 Parabiose entre un embryon d'axolotl de la souche albinos (aa) et un embryon de la souche blanche (dd), 24 heures après l'opération

Fig 12 Parabiose entre un axolotl de la souche albinos (aa) et un axolotl de la souche blanche (dd) Noter la migration au niveau de la soudure des melanophores de l'axolotl blanc qui se sont et les localement dans le parabionte albinos (2 ans, 180 mm)

Fig 13 Parabiose entre deux tritons alpestres (1 an, 85 mm)



Fig. 14 – Téloméiose entre un axolotl de la souche sauvage (DD) et un axolotl de la souche blanche (dd) (5 ans)

Fig. 15 – Téloméiose entre deux pleurodeles (6 ans)

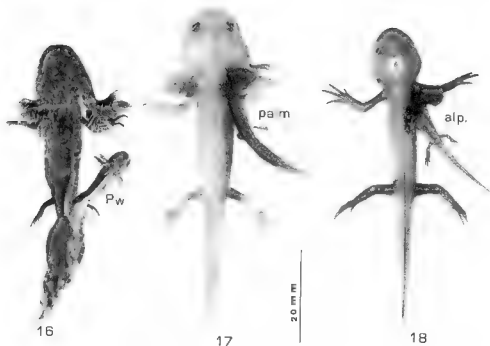
des parabioses pleurodèle/triton alpestre. La métamorphose, légèrement plus tardive par rapport aux conditions normales, est rigoureusement synchrone pour les deux parabiontes. A cette époque ou peu après, l'un des parabiontes est souvent victime de phénomènes de rejet de la part de son partenaire et sa nécrose entraîne la létalité de l'association. La tolérance dans la parabiose xénogénique relève de la même histocompatibilité relative que celle rencontrée pour les xénogreffes embryonnaires (HOULLON, 1966). Par exemple, les parabioses entre les différents tritons, assez proches du point de vue de l'histocompatibilité, ont une longévité bien supérieure aux parabioses entre l'axolotl et le pleurodèle peu histocompatibles (fig. 16).

L'effet free-martin se manifeste dans les parabioses xénogéniques hétérosexuées comme dans les parabioses allogéniques hétérosexuées, mais son analyse est beaucoup plus délicate. En plus des phénomènes d'histocompatibilité interviennent d'autres paramètres tel que le volume des gonades quand une espèce de grande taille est mise en parabiose avec une espèce de petite taille, de même que les différences d'ordre chronologique de la différenciation sexuelle d'une espèce par rapport à l'autre.

L'observation la plus remarquable concerne les parabioses entre l'axolotl, habituellement néoténique, et les tritons alpestre ou palmé (fig. 17), qui se métamorphosent naturellement vers l'âge de dix semaines. Lorsque de telles associations survivent assez longtemps, la métamorphose intervient en quelques jours et d'une manière parfaitement synchrone pour les deux parabiontes vers l'âge de dix mois. L'étude histologique a révélé que la thyroïde du triton était hyperactive alors que la thyroïde de l'axolotl demeurait dans le même état que celle d'un axolotl néoténique (CHARLEMAGNE & HOULLON, 1966). Ceci signifie que le complexe hypophyse-thyroïde du triton est hyperfonctionnel afin d'assurer en même temps la métamorphose des deux parabiontes, cependant que le complexe hypophyse-thyroïde de l'axolotl demeure au repos. La sécrétion thyroïdienne du triton doit être particulièrement abondante pour provoquer d'une part sa propre métamorphose et d'autre part celle de l'axolotl souvent six à dix fois plus volumineux (fig. 18).

### CHIMÈRES

Entre la greffe d'une ébauche embryonnaire et la soudure de deux embryons complets, il existe un moyen terme qui consiste à prendre deux héli-embryons pour reconstituer un embryon composite. L'animal ainsi obtenu est une "chimère" au vrai sens étymologique. Chez un tel animal on ne peut pas définir quelle est la partie "donneur" par rapport à la partie "receveur", on ne discerne pas le greffon de l'hôte. La greffe embryonnaire en chimère consiste à sectionner transversalement deux embryons au stade du bourgeon caudal puis à associer la partie antérieure de l'un avec la partie postérieure de l'autre (fig. 19). Selon l'importance de chaque héli-embryon on réalise une chimère à corps simple lorsque les parties antérieure et postérieure sont complémentaires mais, à la limite, on réalise des chimères à corps double quand on associe un embryon dont on a éliminé le bourgeon de queue avec un embryon dont on a éliminé la tête. Toutes les associations entre ces deux extrêmes sont concevables (CHARLEMAGNE & HOULLON, 1974).



Parabioses xénogéniques.  
Barre= 20 mm.

- Fig 16 Telobiose entre un axolotl et un pleurodèle (Pw) Le pleurodèle (à droite) est en cours de rejet (5 mois, axolotl 60 mm)
- Fig 17 Parabiose xénogénique, non métamorphosée entre un axolotl blanc et un triton palmé (palm) (7 mois, axolotl 70 mm)
- Fig 18 Axolotl métamorphosé de la souche blanche en parabiose avec un triton alpestre (alp) (12 mois, axolotl 70 mm)

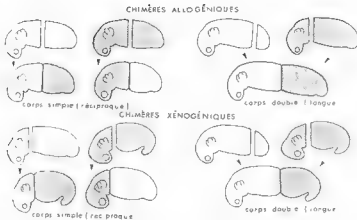


Fig 19 - Principe de la greffe en chimère a corps simple et a corps double entre embryons de la même espèce (chimères allogéniques) et entre embryons d'espèces différentes (chimères xénogéniques)

Depuis les premières chimères obtenues au cours des années 1960 (HOUILLOIN, 1964a-b, 1965) jusqu'aux dernières réalisées avec trois tronçons d'embryons différents (fig. 20) (trichimères, HOUILLOIN, 1984), les associations les plus diverses ont été réalisées. A partir de sept espèces différentes d'urodeles, on peut concevoir 49 associations chimères à corps simple comme à corps double. Il y a théoriquement sept associations allogéniques dont quatre ont effectivement été réalisées avec *P. waltl*, *P. porrett*, *T. alpestris* et *A. mexicanum*. Sur 42 associations xénogéniques théoriquement concevables, 23 ont effectivement été réalisées (HOUILLOIN, 1999).

Une chimère est désignée par l'abréviation de sa partie antérieure et l'abréviation de sa partie postérieure par exemple, "Pw.-Pw" est une chimère allogénique partie antérieure *P. waltl*-partie postérieure *P. waltl*, "Pw.-alp" est une chimère xénogénique partie antérieure *P. waltl*-partie postérieure *T. alpestris*, "alp.-Pw" est une chimère xénogénique inverse de la précédente.

#### ALLOGÉNIQUES

Des que la prise de nourriture est assurée, soit une quinzaine de jours après l'opération, les chimères allogéniques à corps simple et à corps double ont une viabilité comparable à celle des animaux témoins, et 50% d'entre elles atteignent l'âge d'un an. De nombreuses chimères allogéniques ont vécu plus de quatre mois : plus de 300 Pw.-Pw (fig. 22), plus de 150 Ax.-Ax (fig. 23-25), 90 alp.-alp, et 30 Pp.-Pp. L'âge maximum atteint par ces chimères a été respectivement de 15, 10, 6 et 5 ans.

Les chimères allogéniques ont été surtout réalisées en vue d'analyser les interactions entre glandes génitales, plus particulièrement chez les animaux à corps double (HOUILLOIN & CHARLEMAGNE, 1971, HOUILLOIN et al., 1973; HOUILLOIN, 1977-2000, HOUILLOIN & DOURNON,



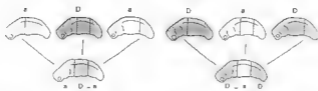


Fig 20 Trichimères entre embryons d'axolotl de la souche albinos (a) et embryons de la souche sauvage (D)

1986) (fig. 21). Dans la combinaison homosexuée femelle antérieur-femelle postérieur ( $\varnothing$ - $\varnothing$ ), les chimères sont pourvues de quatre ovaires, et dans la combinaison homosexuée mâle antérieur-mâle postérieur ( $\delta$ - $\delta$ ), les chimères ont en général quatre testicules. Le point le plus intéressant concerne les combinaisons hétérosexuées car il s'agit d'animaux bien viables chez lesquels des laparotomies successives au cours de leur existence permettent de suivre l'évolution du tractus uro-génital. Le résultat essentiel, mais imprévu et encore inexpliqué, est que l'effet free-martin dépend de la position des ovaires par rapport aux testicules ainsi qu'il est résumé dans le tableau 1 (HOULLON, 2000)

Dans la combinaison hétérosexuée femelle antérieur-mâle postérieur ( $\varnothing$ - $\delta$ ), les ovaires antérieurs sont totalement inhibés (fig. 28) et peuvent même être inversés en testicules sous l'effet des testicules postérieurs normaux. Dans la combinaison hétérosexuée mâle antérieur-femelle postérieur ( $\delta$ - $\varnothing$ ), les testicules antérieurs normaux inhibent peu l'évolution ovarienne postérieure, à un tel point que l'on observe des animaux hermaphrodites avec des testicules antérieurs et des ovaires postérieurs à maturité sexuelle (fig. 29).

Certaines associations allogéniques pour les combinaisons homosexuées sont des "chimères germinales", c'est-à-dire qu'elles peuvent émettre à la fois les gamètes en provenance de la partie antérieure et les gamètes en provenance de la partie postérieure. Ceci a été observé pour des chimères femelles Ax-Ax ( $\varnothing$ - $\varnothing$ ), qui pondaient en même temps des œufs albinos issus des ovaires antérieurs et des œufs pigmentés issus des ovaires postérieurs. De même, à partir de croisements appropriés en utilisant les marqueurs de la pigmentation, il a été démontré que les chimères mâles Ax-Ax ( $\delta$ - $\delta$ ) mettaient en même temps les spermatozoïdes issus des testicules antérieurs et les spermatozoïdes issus des testicules postérieurs.

## XENOGÉNIQUES

Plus délicates à réaliser par suite de la différence de taille des embryons et surtout à cause des degrés d'histocompatibilité, les chimères xénogéniques ont une longévité bien moindre que les chimères allogéniques. Ainsi, s'il est relativement commode de réaliser des chimères entre pleurodèles et tritons (fig. 24), la plupart des chimères entre pleurodèles et axolotls, comme pour les parabioses, sont difficilement viables. D'une manière générale, seulement 20% des animaux bien cicatrisés le lendemain de l'opération atteignent l'époque de la métamorphose vers 3 mois et cet âge également pour les chimères avec une partie antérieure axolotl qui ne se métamorphosent jamais (fig. 26). Sur les 536 chimères xénogéniques prises en

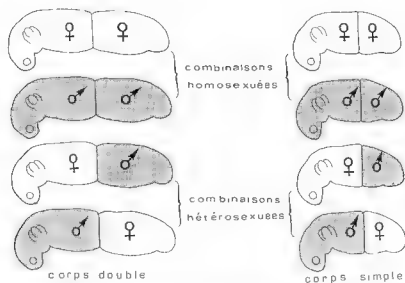


Fig. 21 — Combinaisons sexuelles chez les chimères allogéniques à corps double et à corps simple

Tableau I — Interaction entre glandes génitales de sexe différent chez les Urodèles chimères.

Combinaison sexuelle	Type de chimère	Partie antérieure	Partie postérieure
♀-♂	Corps double	Forté inhibition ovarienne ou inversion ovarienne	Testicules normaux
	Corps simple	Inversion ovarienne	Testicules normaux
♂-♀	Corps double	Testicules normaux	Inhibition ovarienne ± faible ou rare inversion
	Corps simple	Testicules normaux ou légère réduction	Inhibition ovarienne + faible ou fréquente inversion

compte à partir de trois mois, il en restait 181 à un an (34 %) mais seulement 23 (4,3 %) à l'âge de quatre ans (HOULLON, 1999).

L'analyse des interactions dans la sphère uro-génitale est aussi délicate que pour les parabioses xénogéniques car en plus les retards de croissance sont fréquents. A ce sujet, il a été remarqué que la taille des chimères xénogéniques demeurait harmonieuse même quand une espèce de grande taille, par exemple le pleurodèle, était associée avec une espèce de petite taille, par exemple le triton vulgaire. La partie à laquelle appartient l'espèce de grande taille semble ralentir sa croissance pour s'adapter à la partie qui appartient à une espèce de petite taille (fig. 27)

La maturité sexuelle n'a pas encore été observée chez les chimères xénogéniques à corps double, mais elle a été souvent observée chez les chimères xénogéniques à corps simple. Notons que par suite de la technique opératoire, le prélèvement de la partie antérieure se faisant toujours en avant de la région génitale présomptive, ces animaux ne possèdent que les gonades de la partie postérieure. Une fois adultes, les chimères xénogéniques à corps simple ne seront jamais "germinales" puisque leurs gamètes ne peuvent provenir que de leur partie postérieure. Sur 268 chimères xénogéniques à corps simple, pres de 20 % ont atteint la maturité sexuelle dont 25 mâles sur 136 et 26 femelles sur 132.

Le comportement sexuel de ces chimères est particulièrement remarquable. C'est ainsi qu'une chimère P.w.-alp. (partie antérieure *P. waltii* partie postérieure *T. alpestris*) âgée de deux ans, mise en présence d'un pleurodèle femelle, s'est accouplée avec cette femelle selon l'amplexus classiquement observé chez *Pleurodeles* dans les conditions naturelles. Ensuite, remise en présence d'un triton alpestre femelle, il n'y a pas eu d'amplexus mais des ondulations de la queue comme lors de la parade nuptiale chez les tritons. Ainsi une chimère xénogénique adulte peut manifester successivement le comportement sexuel propre à l'espèce de sa partie antérieure et le comportement sexuel propre à l'espèce de sa partie postérieure (HOULLON, 1992)

## TÉRATOMES ET TÉRATOCARCINOMES EXPÉRIMENTAUX

Les tumeurs spontanées sont peu fréquentes chez les amphibiens et en particulier chez les urodèles. Depuis un demi-siècle que le pleurodèle est d'un usage courant comme matériel biologique, le seul cas rapporté est celui d'une tumeur maligne entretenue par des transplantations successives durant près de cinq années dans notre laboratoire (PLAÇAIS, 1974). La rareté des tumeurs naturelles tout comme la difficulté à induire des tumeurs par les substances cancérigènes chez les urodèles ont conduit à rechercher la capacité du pleurodèle et de l'axolotl à produire des tératomes, voire des tératocarcinomes, de la même manière que chez la souris de telles formations sont obtenues après l'implantation d'embryons en des sites extra-utérins.

Le principe de l'opération consiste, après anesthésie, à pratiquer une légère incision sur le flanc de l'animal receveur, puis à inoculer trois à six embryons dans la cavité générale (fig. 34). Les animaux opérés sont des larves âgées de 7 à 8 semaines pour les plus jeunes (40 mm)



## Chimères

Barre = 20 mm

Fig 22 Chimère allogénétique *P waltii* *P waltii* (Pw-Pw), mâle à corps presque double avec duplication des membres intermédiaires (4 ans, 220 mm) Les membres intermédiaires sont les membres antérieurs (quatre doigts) de la partie postérieure

Fig 23 Paire de chimères allogénétiques à corps simple (chimères réciproques) entre axolotls de la souche blanche (dd) et axolotls de la souche albinos (aa) Les plages pigmentaires au niveau des parties blanches (12 mois, 155 mm)

jusqu'à des individus âgés de 4 à 5 mois (65 à 85 mm), ce qui correspond pour le pleurodele à des animaux métamorphosés.

Les embryons implantés vont des stades de la segmentation aux stades proches de l'éclosion. Une fois dégangés, les embryons sont inoculés à l'aide d'une pipette de verre calibrée à la taille des implants. Des points de suture sont indispensables pour refermer l'incision et éviter l'expulsion des embryons. La principale difficulté est d'éviter l'écrasement des jeunes embryons dégangues particulièrement fragiles jusqu'au stade du jeune bourgeon caudal. La mortalité post-opératoire est pratiquement nulle. Les animaux opérés sont sacrifiés entre trois mois et quatre ans après l'opération. La présence de tératomes se détecte à la suite d'une laparotomie mais bien souvent la simple palpation permet de percevoir la présence de nodules tumoraux.

#### ALLOGÉNIQUES

Sur 245 pleurodeles larvaires ou métamorphosés ayant reçu des implants embryonnaires de pleurodele, 97 ont présenté des tératomes ou des tératocarcinomes (fig. 31), et sur 76 axolotls juvéniles ayant reçu des implants embryonnaires d'axolotl, 69 avaient développé également des tératomes ou des tératocarcinomes (fig. 32). Ainsi 40 % des pleurodeles et jusqu'à 90 % des axolotls peuvent développer des tératomes ou des tératocarcinomes allogéniques (HOULLON, 1988).

#### XÉNOGÉNIQUES

Des embryons d'axolotl ont été implantés dans la cavité générale de pleurodeles, de même que des embryons d'axolotl en même temps que des embryons de pleurodele. Sur un total de 287 opérations, 194 pleurodeles, soit 68 %, ont développé des tératomes ou des tératocarcinomes xénogéniques (fig. 33) (HOULLON, 1989).

Fig. 24 Remarquable chimère xénogénique à corps double *P. waltl* - *T. helveticus* (Pw-palm), opération le 6 juin 1961, chimère morte le 7 août 1965 (50 mois, 85 mm)

Fig. 25 Axolotl trichimère : partie antérieure albinos (aa) - partie moyenne sauvage (DD) - partie postérieure albinos (aa) (9 mois, 150 mm). Métamorphose spontanée à 6 mois, mort à 13 mois. Pas de migration des melanophores DD dans la partie antérieure aa mais légère migration des melanophores DD dans la partie postérieure aa

Fig. 26 Vases ventrales de chimeres xénogéniques entre *T. alpestris* (alp.) et axolotls de la souche sauvage (Ax). A gauche la chimère a.p.-Ax âgée de 6 mois (56 mm), s'est métamorphosée à 3 mois à côté de la chimère Ax-alp. âgée de 6 mois est restée néoténique (72 mm)

Fig. 27 Vases ventrales de chimeres xénogéniques entre *T. vulgatus* (vulg.) et *P. waltl* (Pw). A gauche, chimère vulg.-Pw (22 mois, 92 mm), à droite chimère mâle Pw-vulg. à maturité sexuelle (22 mois, 70 mm)



Tractus uro-génital et teratomes.  
Barre= 20 mm

Fig 28 - Chânière adogénétique à corps double *P. aulif* - *P. aulif* (Pw-Pw) de la combinaison hétérosexuée femelle antérieure - mâle postérieure (1-2) inhibition totale des ovaires antérieurs (o a) (effet free martin) et testicules postérieurs normaux (t p). Les corps jaunes adipeux antérieurs et postérieurs n'ont pas été enlevés (32 mois, 220 mm)

Des embryons de pleurodele ont été implantés dans la cavité générale d'axolotls, de même que des embryons de pleurodele en même temps que des embryons d'axolotl. Sur un total de 44 opérations, 9 axolotls (20 %) ont développé des tératomes xénogéniques. Un seul cas de tératome xénogénique sur 35 opérations a été observé à la suite de l'implantation d'embryons de triton alpestre chez le pleurodele. Par contre, 19 cas de tératomes xénogéniques sur 31 opérations (61 %) ont été observés à la suite de l'implantation d'embryons de triton alpestre chez l'axolotl.

Les différents pourcentages de tératomes ou de tératocarcinomes xénogéniques obtenus chez le pleurodele, l'axolotl et le triton alpestre s'interprètent facilement par les différents degrés d'histocompatibilité entre ces urodeles, au même titre que pour les greffes embryonnaires, les parabioses et les chimères xénogéniques. Plusieurs nodules de tératome s'observent le plus souvent chez un même animal puisque plusieurs embryons sont inoculés en même temps mais parfois il n'existe qu'un seul nodule. Dans ce cas il s'agit d'un "tératome chimère" surtout lorsqu'il provient de l'implantation simultanée d'embryons d'espèces différentes.

Les tératomes se classent en trois catégories selon leur importance. Une première catégorie concerne ceux dont la croissance est à peine marquée, leur poids correspond à moins de 1 % du poids de l'hôte. Une deuxième catégorie concerne les tératomes qui évoluent au même rythme que l'hôte; ils peuvent atteindre au maximum 4 à 5 % du poids de l'hôte. Pour une troisième catégorie la croissance paraît incontrôlée, ils dépassent 10 % et parfois jusqu'à 40 % du poids de l'hôte (fig. 31-32). Ces tératomes sont "déstabilisés", leur croissance anarchique provoque la cachexie et finalement la mort de l'hôte. De telles tumeurs destabilisées peuvent être considérées comme malignes ce sont des tératocarcinomes. Elles affectent davantage les implants d'embryons d'axolotl (30 à 40 % des tératomes) que les implants d'embryons de pleurodele (20 % des tératomes).

Fig. 29 Chimère allogénique à corps double *T. alpestris* × *T. alpestris* (alp. alp.) de la combinaison hétérosexuée mâle antérieur (♂ -♂) testicules antérieurs (t a) et ovaires postérieurs (o p) à maturité sexuelle (pas d'effet free-martin, animal hermaphrodite, 22 mois, 110 mm).

Fig. 30 Tolérance d'un ovaire d'axolotl (o Ax) transplanté chez un triton alpestre (39 mois). La transplantation a été faite avec des ovaires d'axolotl juvénile âgé de 5 mois après l'ablation des ovaires du triton alpestre âgé de 8 mois. Malgré la maturité sexuelle de l'ovaire transplanté le triton alpestre ne peut pas pondre les trop gros ovocytes d'axolotl.

Fig. 31. - Tératocarcinome allogénique chez un pleurodele âgé de 17 mois qui avait reçu cinq gastrulas de pleurodele, 13 mois plus tôt au moment de la métamorphose.

Fig. 32. Tératocarcinomes allogéniques chez un axolotl albinos âgé de 11 mois qui avait reçu sept gastrulas d'axolotl albinos, 6 mois plus tôt.

Fig. 33. Tératomes xénogéniques isolés provenant de divers pleurodeles ayant reçu des embryons d'axolotl: (a) tératomes (poids 0,90 g et 0,45 g) provenant d'un pleurodele âgé de 38 mois qui avait reçu trois blastulas d'axolotl albinos, 34 mois plus tôt en fin de métamorphose, (b) tératome (poids 0,50 g) provenant d'un pleurodele âgé de 14 mois qui avait reçu trois embryons d'axolotl sauvage au stade bourgeon caudal jeune, 11 mois plus tôt à l'état larvaire, (c) tératomes (poids 1,10 g et 0,60 g) provenant d'un pleurodele âgé de 37 mois qui avait reçu trois embryons d'axolotl albinos au stade bourgeon caudal âgé, 33 mois plus tôt en fin de métamorphose.

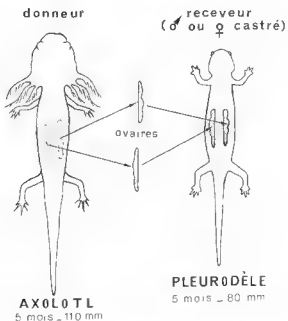


Fig. 34 - Inoculation d'embryons de pleurodèle, ou d'axolotl, dans la cavité générale d'une larve de pleurodèle pour obtenir des tératomas.

Histologiquement, on reconnaît les tissus les plus divers sans organisation et dont l'importance varie selon les tératomas: nodules de cartilage, épithélium intestinal, formations tubulaires comme dans une structure rénale, tissu nerveux, mince épithélium qui limite les vésicules d'ascite, épiderme avec des lambeaux de mue en cours de desquamation, peu de tissu musculaire mais abondant tissu conjonctif dans tous les cas. Dans les tumeurs déstabilisées la nature carcinomateuse est attestée par les nombreuses mitoses, les noyaux pycnotiques à côté des noyaux polylobes avec plusieurs gros nucléoles, l'intense vascularisation et les nombreuses hématies qui infiltrent tous les tissus. La structure histologique bénigne ou maligne varie d'une tumeur à l'autre sans qu'il soit possible d'établir la relation entre le stade de l'implant embryonnaire et l'âge de l'hôte.

#### TRANSPLANTATIONS OVARIENNES

L'incompatibilité relative entre les divers urodèles, et plus spécialement l'étonnante tolérance des greffes embryonnaires d'axolotl par les autres, furent mises à profit pour réaliser des transplantations d'ovaires. Le principe de l'intervention consiste dans un premier temps à castrer un animal juvénile, mâle ou femelle, quelques mois après la métamorphose, puis dans





Fig 35 - Xénotransplantation des ovaires d'axolotl dans un pleurodele javemie, mâle ou femelle, qui a été préalablement castré

un deuxième temps à prélever les ovaires d'un animal sensiblement au même âge dont les ovocytes sont en prévitellogénèse pour ensuite implanter ces ovaires dans la cavité générale des receveurs castrés. Les transplants ovariens sont placés dorsalement en position orthotopique de façon à obtenir des adhérences au niveau des zones cicatricielles résultant de la castration (fig. 35). La mortalité post-opératoire est pratiquement nulle. Les animaux opérés poursuivent leur développement normal pour atteindre l'état adulte un à deux ans plus tard.

#### ALLOGÉNIQUES

Les interventions ont été réalisées à partir de pleurodèles métamorphosés âgés de 4 à 5 mois (65 à 85 mm). Les receveurs castrés sont aussi bien des pleurodèles femelles que des pleurodèles mâles. Seize animaux (8 mâles et 8 femelles) appartenant à la même souche histocompatible furent castrés, la reprise des ovaires fut effective chez tous. Quand il s'agit de pleurodèles standards, qui n'appartiennent pas à des souches histocompatibles, la reprise des allotransplants ovariens intervient dans 85 % des cas aussi bien chez les femelles castrées que chez les mâles castrés. Ces animaux peuvent pondre dès l'âge de deux ans.

La même intervention fut tentée afin de transplanter les ovaires de pleurodèles femelles adultes qui avaient séjourné pendant 12 jours en microgravité dans le biosatellite russe "Cosmos 2229" fin 1992-début 1993 (DOURNON et al., 1997). Ces femelles devaient être nécessairement sacrifiées dès leur retour pour être utilisées par divers expérimentateurs. Une fois prélevés, des fragments d'ovaire furent transplantés dans des pleurodèles mâles ou femelles castrés, juvéniles et adultes. Sur 25 animaux opérés, seulement 7 survécurent aux conditions particulières lors de cette expérience, néanmoins la reprise des allotransplants ovariens adultes fut effective chez 6 pleurodèles.

#### XÉNOGÉNIQUES

Le protocole opératoire ci-dessus fut appliqué pour transplanter des ovaires d'axolotl chez le pleurodele (HOULLON, 1972) et chez le triton alpestre (HOULLON, 1975), de même que pour des transplants ovariens entre le pleurodele et le triton alpestre. Pour les transplantations d'ovaires d'axolotl, les donneurs sont âgés de 5 à 6 mois (100 mm) et les pleurodèles ou les

tritons alpestres receveurs sont âgés de 7 à 9 mois. Sur 124 pleurodèles castrés et transplantés avec des ovaires d'axolotl, 34 mâles sur 55 et 41 femelles sur 69 ont présenté plus tard des ovaires d'axolotl. La plupart de ces ovaires ont atteint la maturité sexuelle de sorte que des pleurodèles ont pondu systématiquement des oeufs d'axolotl.

La reprise effective des ovaires d'axolotl fut également observée chez des tritons alpestres castrés (4 mâles sur 4 et 4 femelles sur 7). Cependant, bien que les ovaires aient atteint la maturité sexuelle, les tritons alpestres n'ont jamais pu pondre d'oeufs d'axolotl car les ovocytes d'axolotl sont trop volumineux pour pouvoir transiter dans les oviductes de triton alpestre (fig. 30).

Les xénotransplants ovariens entre le pleurodèle et le triton alpestre sont tolérés mais avec un succès très variable selon le sens de la transplantation. Le triton alpestre tolère assez bien les xénotransplants ovariens de pleurodèle (10 cas sur 24) mais les ovocytes de pleurodèle ne peuvent pas transiter dans les oviductes du triton alpestre. En revanche, la tolérance du pleurodèle pour les xénotransplants ovariens de triton alpestre est très faible (3 cas sur 26) mais il a pu être obtenu l'émission d'oeufs de triton alpestre par un pleurodèle.

En plus des transplantations d'ovaires, quelques xénotransplantations de testicules juvéniles d'axolotl ont été tentées avec succès dans des pleurodèles juvéniles castrés sans espoir pourtant d'obtenir l'émission de spermatozoïdes hétérologues puisque le rétablissement des connexions anatomiques pour l'émission des gamètes mâles est inconcevable chez les amphibiens. C'est ainsi que chez 15 pleurodèles, dont 10 mâles castrés sur 12 et 5 femelles castrées sur 5, des testicules d'axolotl furent tolérés et atteignirent la maturité sexuelle.

Les oeufs d'axolotl pondus par le pleurodèle ont un développement en apparence normal quand ils peuvent être fécondés artificiellement par des spermatozoïdes d'axolotl. Il en est de même pour les oeufs de triton alpestre pondus par le pleurodèle quand ils peuvent être fécondés artificiellement par des spermatozoïdes de triton alpestre. Cependant dans les deux cas, l'étude du développement n'a pas été envisagée d'une manière approfondie.

### AUTRES INTERVENTIONS EMBRYONNAIRES

En utilisant toujours *P. naltl* comme matériel biologique, les autres expérimentations ci-dessous furent réalisées.

#### ORGANOGENESE DE LA GONADE

Le blocage unilatéral de l'uretère primaire (canal de Wolff) au stade du jeune bourgeon caudal avant sa croissance provoque l'absence de mésonephros du même côté. Les cellules germinales primordiales se mettent en place normalement, mais en absence de la médulla gonadique qui provient du blastème mésonephrétique les cellules germinales non seulement

ne prolifèrent pas, mais dégèrent. L'absence de mésonephros a pour conséquence l'agénésie et même l'absence de glande génitale (HOUILLO, 1956).

#### FORMATION DU CANAL DE MÜLLER

L'ablation précoce du pronéphros provoque l'absence du canal de Müller. Toute absence locale ou déviation du canal de Wolff se traduit par une absence ou une déviation comparable du canal de Müller. La formation du canal de Müller est liée à la présence du pronéphros et au voisinage ininterrompu de son extrémité en voie de croissance avec le canal de Wolff qui lui sert de guide pour atteindre le cloaque (HOUILLO, 1959).

#### INVERSION DU PHÉNOTYPE SEXUEL FEMELLE PAR LA TEMPÉRATURE

Chez le pleurodèle, le déterminisme génétique du sexe obéit au mécanisme mâle ZZ-femelle ZW (hétérogamétie femelle). L'élevage des larves à la température du laboratoire ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) donne une sex-ratio normale : 50 % de mâles et 50 % de femelles. Des larves ZW, élevées à la température de  $32^\circ\text{C}$  jusque peu avant la métamorphose, se différencient en mâles (thermo-néo-mâles) dans 100 % des cas. L'inversion du phénotype sexuel de ces larves a été prouvée par diverses analyses génétiques, notamment par l'étude de la descendance issue du croisement entre une femelle standard ZW et un "thermo-neo-mâle ZW". Comme attendu, de tels croisements ont donné, à la température du laboratoire, 25 % de mâles et 75 % de femelles dont 25 % de femelles WW viables (HOUILLO & DOURNON, 1978; DOURNON & HOUILLO, 1984, 1985; DOURNON et al., 1990).

#### CLONAGE DU PLEURODÈLE À PARTIR DU NOYAU DES CELLULES GERMINALES

La greffe nucléaire fut appliquée au pleurodèle au début des années 60 (SIGNORIT & PICHIRAI, 1962). Cependant, seuls les noyaux prélevés au stade de la blastula permettent d'obtenir un développement normal jusqu'à l'état adulte. Les noyaux prélevés à des stades ultérieurs conduisent à des développements s'interrompant d'autant plus tôt que l'embryon donneur est plus âgé; aucun développement n'est obtenu à partir du bourgeon caudal. Et pourtant, les noyaux des cellules germinales, qui ne sont identifiables dans les crêtes génitales que peu après l'éclosion (larves de 15 jours), conduisent à des développements complets. La totipotence des noyaux germinaux persiste au moins jusqu'à la métamorphose. On peut encore cloner le pleurodèle avec des noyaux issus de cellules germinales prélevées directement dans les testicules ou les ovaires d'animaux âgés de quatre mois et obtenir des pleurodèles adultes capables de se reproduire (LISIMPTI et al., 1987). À ce jour, pour réussir le clonage, tant chez les amphibiens que chez les mammifères, avec des noyaux de cellules embryonnaires âgées ou avec des noyaux de cellules somatiques différenciées, il est nécessaire que ces noyaux aient subi au préalable un traitement particulier (reprogrammation).

### EXPÉRIENCE "FERTILE"

Depuis l'apparition de la vie sur notre planète, les organismes vivants ont évolué, se sont développés et adaptés à la gravitation terrestre ( $g_1$ ). Le développement d'un vertébré est-il possible en apesanteur ( $g_0$ )? Des avril 1987, nous avons soumis au Centre National d'Etudes Spatiales (CNES) un projet destiné à l'étude de la fécondation et du développement du pleurodele dans l'espace. Le laboratoire de Biologie du Développement de Toulouse (Mme A-M Duprat) y fut associé fin 1987 ainsi que le laboratoire de Biologie expérimentale et Immunologie de Nancy (Prof. C. Dournon) à partir de 1989. La mise au point du projet a nécessité la résolution de nombreux problèmes liés aux contraintes des vols spatiaux, en particulier l'obtention certaine d'une ponte à un moment précis et la survie d'embryons dans le milieu aquatique nécessairement très réduit. L'expérience FERTILE (Fécondation et Développement du Triton dans l'Espace) s'est déroulée dans la station MIR en 1996 avec la participation de la Cosmonaute française Claude André-Deshays. Cette expérience fut reprise au printemps 1999 dans la même station orbitale avec la participation de Jean-Pierre Haigroner.

Les résultats essentiels sont que la fécondation s'avère possible et que le développement ne semble guère perturbé par l'absence de pesanteur durant une dizaine de jours. Des pleurodèles conçus dans l'espace, et qui ont débuté leur développement en microgravité jusqu'à un stade proche de l'éclosion, atteignent maintenant l'âge adulte et peuvent se reproduire.

### CONCLUSIONS

Les résultats des interventions embryonnaires rapportées posent autant de problèmes qu'ils en résolvent, mais n'est-ce pas le propre de toute expérimentation biologique en raison de la complexité des phénomènes vitaux? L'intérêt des xénogreffes embryonnaires est d'avoir mis en évidence des degrés d'histocompatibilité entre différentes espèces, ce qui permet une comparaison phylogénétique autre que celle basée sur les caractères anatomiques. Cette histocompatibilité relative est corroborée par les parabioses et les chimères. L'étude de la viabilité de ces animaux expérimentaux devrait permettre une nouvelle approche des phénomènes immunitaires encore peu connus pour les xénogreffes. La reconnaissance d'un "soi xénogénique" au cours de la période d'acquisition de la maturité immunologique. L'axolotl, donneur universel de xénogreffes, est un cas étonnant qui pourrait s'interpréter par ses caractères primitifs: il ne posséderait que les antigènes de transplantation communs à tous les autres urodèles. Et si chez les mammifères il pouvait se trouver un tel donneur universel? Quel merveilleux matériel ce pourrait être pour les xénotransplantations d'organes.

La parabiose, qui est la réalisation expérimentale du free martinisme des bovidés, trouve avec les associations xénogéniques une nouvelle approche qui met davantage l'accent sur l'énigmatique effet de position dans les interactions gonadiques chez les chimères hétérosexuées. L'absence d'interprétation ne peut qu'inviter à poursuivre l'expérimentation.

La plus ou moins grande viabilité des chimères xénogéniques implique des mécanismes immunologiques encore inconnus. Après une évolution apparemment normale durant plusieurs mois, certaines périssent brutalement en quelques jours, d'autres s'amaigrissent lentement mais inexorablement pour atteindre un état de cachexie extrême; une troisième catégorie présente des plages de nécrose incurable au niveau de l'une des hémiparties: il s'agit en l'occurrence d'une véritable maladie auto-immune, où tout se passe comme si la partie saine rejetait l'autre. Enfin pourquoi une quatrième catégorie de chimères demeurent-elles viables sans jamais présenter de signe pathologique?

La faible antigénicité des ovaires révélée par les allo- et les xénotransplantations n'a guère été envisagée pour les vertébrés supérieurs et l'éthique ne permet pas de songer à une application pour remédier à la stérilité féminine! Mais pourtant, l'accroissement des ovocytes dans un organisme étranger est-il vraiment sans influence sur le développement ultérieur? Serait-il abusif de parler ici de tentative de transgénèse par le biais d'informations étrangères qui s'intégreraient dans l'ovocyte au cours de son accroissement?

D'une particulière originalité, les tératocarcinomes expérimentaux ne sauraient laisser indifférent compte tenu de leurs implications chez les mammifères. Quand, comment et pourquoi certaines cellules deviennent-elles malignes? Ces questions font partie des préoccupations les plus actuelles concernant les relations entre cellules embryonnaires et cellules tumorales.

Enfin, pour revenir à l'organogenèse initiale des gonades, quels sont les facteurs de croissance pour les cellules germinales primordiales qui, émanant du blastème mesonéphrétique, permettent leur persistance et leur prolifération? Pourquoi la prolifération rapide des cellules germinales primordiales est-elle le premier indice de la différenciation ovarienne alors qu'une prolifération lente conduira à une différenciation testiculaire?

Et c'est ainsi qu'à travers des manipulations, classiques pour quelques-unes, originales pour la plupart, les amphibiens gardent tout leur intérêt comme matériel expérimental de choix, sans oublier les aspects moléculaires envisagés ces dernières décennies, pour aborder avec profit l'embryologie du 21<sup>e</sup> siècle.

## RÉSUMÉ.

Des interventions aux stades embryonnaires ont été réalisées entre sept espèces d'amphibiens urodeles, *Pleurodeles waltl*, *Pleurodeles poireti*, *Triturus alpestris*, *Triturus helveticus*, *Triturus vulgaris*, *Triturus cristatus* et *Ambystoma mexicanum*.

La tolérance ou le rejet des greffes de téguments embryonnaires dépend du degré d'histocompatibilité entre les sept espèces. L'axolotl se comporte comme un "donneur universel" pour les autres urodeles. La tolérance des ébauches gonadiques présomptives permet d'obtenir l'émission d'œufs d'une espèce par une autre espèce.

La survie des parabioses xénogéniques confirme l'histocompatibilité relative observée avec les greffes de tégument. La métamorphose de l'axolotl en parabiose avec un triton est provoquée par l'hypersecretion thyroïdienne du triton.

Sur 49 associations en chimères théoriquement concevables entre les embryons des sept espèces, 4 associations allogéniques (chimères entre embryons de la même espèce) ont effectivement été réalisées (plus de 570 chimères âgées de 4 mois à 15 ans) et 23 associations xénogéniques (chimères entre embryons d'espèces différentes) ont été réalisées (536 chimères âgées de 3 mois à 7 ans). Les chimères allogéniques sont viables au même titre que les animaux standards. Les chimères à corps double sont pourvues de deux paires de gonades. Dans les combinaisons homosexuelles, les animaux ont soit quatre ovaires soit quatre testicules fonctionnels (chimères germinales). Dans les combinaisons hétérosexuées, les interactions entre gonades de sexes différents dépendent de leur position relative. L'effet free-martin (inhibition et même inversion des ovaires) s'observe lorsque les ovaires sont antérieurs par rapport aux testicules, l'effet free-martin est faible et même souvent nul lorsque les ovaires sont postérieurs par rapport aux testicules; dans ce cas l'évolution des ovaires postérieurs est peu modifiée par les testicules antérieurs.

La survie des chimères xénogéniques dépend des espèces associées et du sens de l'association. Les chimères xénogéniques qui atteignent l'état adulte peuvent manifester le comportement sexuel de l'espèce qui constitue sa partie antérieure et de l'espèce qui constitue sa partie postérieure.

Les urodèles, qui ne présentent qu'exceptionnellement des tumeurs spontanées, développent des tératomes après l'implantation d'embryons, allogéniques ou xénogéniques, dans la cavité générale des jeunes larves. Certaines de ces tumeurs expérimentales restent bénignes mais d'autres se déstabilisent pour devenir des tératocarcinomes.

Les ovaires prélevés chez des animaux juvéniles et transplantés dans des jeunes animaux, mâles ou femelles castrés, peuvent être indéfiniment tolérés même quand il s'agit de xéno-transplants.

La tolérance des ovaires d'axolotl par le pleurodèle permet l'émission systématique d'ocufs d'axolotl par le pleurodèle. Après fécondation artificielle, les ovocytes, qui ont effectué tout leur accroissement dans un organisme étranger, ont un développement en apparence normal.

L'histocompatibilité relative des xéngreffes embryonnaires, la survie des parabioses et des chimères xénogéniques, l'effet free-martin de position dans les interactions entre glandes génitales, la formation et la déstabilisation des tératomes expérimentaux sont autant de phénomènes originaux qui demeurent énigmatiques.

## REMERCIEMENTS

Grâce à la bienveillance du Professeur Alain Dubois et à l'aide efficace de Mme Annemarie Ohler, la plupart des pièces anatomiques correspondant aux expériences rapportées ont pu être classées et conservées en zoothèque au laboratoire des Reptiles et Amphibiens du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris, où elles sont enregistrées sous les numéros de collection MNHN 1997 6600-8200.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BORN, G., 1897 Über Verwachsungsversuche mit Amphibienlarven *Roux's Arch. Entom.*, **4** 349-365
- BRIGGS, R. & KING, J.T., 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, **38**: 455-463.
- BURNS, R. K., 1925 The sex of parabiotic twins in Amphibia *J. exp. Zool.*, **42** 31-89
- CHABRY, L., 1887 Contribution à l'embryologie normale et tératologique des ascidies simples. *J. Anat. Physiol.*, **23**, 167.
- CHARIEMAGNE, J. & HOUILLON, C., 1966 Activités thyroïdiennes au cours de la métamorphose chez les urodèles associés en parabiose. *C. r. Acad. Sci. Paris*, (D), **262**: 897-900
- 1974 Analyse morphologique des chimères obtenues par greffes embryonnaires chez les amphibiens urodèles. *J. Embry. exp. Morph.*, **31** 263-286
- DOURNON, C., AIMAR, C., BAUTZ, A., ROPARS, A. & HOUILLON, C., 1997 Grafts of ovaries in males and females of *Pleurodeles waltli* (Urodela, Amphibia): evidence of a long-term tolerance of allografts, application following a space biology experiment *Repr. Nutr. Dév.*, **37** 637-649
- DOURNON, C. & HOUILLON, C., 1984 Démonstration génétique de l'inversion fonctionnelle du phénotype sexuel femelle sous l'action de la température d'élevage chez l'amphibien urodèle. *Pleurodeles waltli* Michah. *Repr. Nutr. Dév.*, **24** (4): 361-378.
- 1985 Thermosensibilité de la différenciation sexuelle chez l'amphibien urodèle. *Pleurodeles waltli* Michah. Conditions pour obtenir l'inversion du phénotype sexuel de toutes les femelles génétiques sous l'action de la température d'élevage. *Repr. Nutr. Dév.*, **25** (4A): 679-688.
- DOURNON, C., HOUILLON, C., & PHAL, C. 1990 Temperature sex-reversal in amphibians and reptiles. *Int. J. dev. Biol.*, **34**, 81-92
- DRISCH, H., 1891 Entwicklungsmechanische Studien. I. Der Werth der beiden ersten Furchungszellen in der Echinodermmentwicklung. Experimentelle Erzeugung von Theil- und Doppelbildungen. *Z. wiss. Zool.*, **53** 160-182
- HOUILLON, C., 1956 Recherches expérimentales sur la dissociation médullo-corticale dans l'organogenèse des gonades chez le triton *Pleurodeles waltli* Michah. *Bull. biol. Fr. Belg.*, **90** 360-445
- 1959 Analyse expérimentale des relations entre le canal de Wolff et le canal de Müller chez le triton *Pleurodeles waltli* Michah. *Bull. biol. Fr. Belg.*, **93**: 289-314
- 1964a Chimères xenoplastiques entre les urodèles *Pleurodeles waltli* Michah et *Triturus alpestris* Laur. *C. r. Acad. Sci. Paris*, (12), **258** 3901-3903
- 1964b Nouvelles chimères xenoplastiques chez les urodèles: combinaisons viables et létales. *C. r. Acad. Sci. Paris*, (12), **258**, 5725-5728
- 1965 Associations en chimères entre l'axolotl et diverses espèces de triton. *C. r. Acad. Sci. Paris*, (12), **261**: 246-248
- 1966 Métamorphose et tolérance dans la parabiose hétérogène chez les urodèles. *C. r. Acad. Sci. Paris*, (D), **262**, 136-138
- 1967 Greffes embryonnaires de peau entre *Ambystoma mexicanum* Shaw, *Pleurodeles waltli* Michah et *Triturus alpestris* Laur., phénomènes de tolérance et de rejet. *C. r. Acad. Sci. Paris* (D) **264** 834-837.
- 1972 Tolérance des greffes ovariennes entre espèces différentes chez les amphibiens urodèles, conséquences sur l'émission de pontes hétérologues. *C. r. Acad. Sci. Paris*, (D) **274** 2790-2793
- 1973 Greffes de gonades entre les amphibiens urodèles, *Pleurodeles waltli* Michah et *Ambystoma mexicanum* Shaw, conséquences sur l'émission de pontes hétérologues. *C. r. Acad. Sci. Paris* (D), **277**: 2245-2248
- 1975 Evolution des xenogreffes de gonades embryonnaires et des ovaires juvéniles de *Ambystoma mexicanum* Shaw, transplantées sur *Triturus alpestris* Laur. *C. r. Acad. Sci. Paris* (D), **281** 171-174
- 1977 Tractus uro-génital des chimères chez l'amphibien urodèle, *Triturus alpestris* Laur. *J. Embry. exp. Morph.*, **42** 15-28
- 1984 - Chimères viables obtenues à partir de trois tronçons provenant de trois embryons différents chez l'amphibien urodèle *Ambystoma mexicanum* Shaw. *C. r. Acad. Sci. Paris*, (3), **299**: 25-30

- 1988 Production de teratomes à partir d'implants embryonnaires allogéniques chez l'amphibien urodèle, *Pleurodeles waltli* Michah. *C r Acad Sci Paris*, (3), **306**: 213-219
- 1989 Teratomes expérimentaux à partir d'implants embryonnaires xénogéniques chez l'amphibien urodèle, *Pleurodeles waltli* Michah. *C r Acad Sci Paris*, (3), **308**: 229-236
- 1992 - Reproduction et comportement sexuel chez les urodèles chimeres. *Bull Soc zool Fr*, **117**(2), 179-187
- 1999 Les urodèles chimères. I Aspect morphologique. *Bull Soc zool Fr*, **124** 3-37
- 2000 Les urodèles chimères. II Tractus uro-génital. *Bull Soc zool Fr*. **125** 87-130
- HOUILLOU, C & BAGNARA, J T. 1996 Insights in pigmentary phenomena provided by grafting and chimera formation in the axolotl. *Pigment Cell Res*, **9** 281-288.
- HOUILLOU, C & CHARLEMAGNE, J. 1971 Développement d'un double système de glandes génitales dans les chimeres homoplastiques a corps double chez l'amphibien urodèle, *Pleurodeles waltli* Michah. *C r Acad Sci Paris*, (D), **272** 1546-1549
- HOUILLOU, C, CHARLEMAGNE, J. & GOUJON P. 1973 Hermaphrodisme des chimeres allogéniques chez l'amphibien urodèle, *Pleurodeles waltli* Michah. *C r Acad Sci Paris*, (D), **276** 1617-1620
- HOUILLOU, C & DOIRON, C., 1978. Inversion du phénotype sexuel femelle sous l'action d'une température élevée chez l'amphibien urodèle, *Pleurodeles waltli* Michah. *C r Acad Sci Paris*, (D), **286**. 1475-1478
- 1986. Evolution du tractus uro-génital chez les pleurodeles chimeres a corps double Effet de position dans les interactions entre glandes génitales de sexe différent. *Repr Nutr Dev*, **26** (5A) 1115-1135.
- HOUILLOU, C, TOURNIEER, A & CHARLEMAGNE J. 1969. Antigenicite relative des hétérogreffes embryonnaires de tégument chez les amphibiens urodèles *Ambystoma mexicanum* Shaw, *Triturus helveticus* Raz., *Triturus alpestris* Laur et *Pleurodeles waltli* Michah. *C r Acad Sci Paris*, (D), **268**, 2982-2985
- LESIMPLE, M., DOIRON, C. & HOUILLOU, C. 1990. Melanin as a natural germ cell marker for intraspecific experiments in *Ambystoma mexicanum* (Urodela, Amphibia). *Roux's Arch des Biol* **198**: 420-429
- LESIMPLE, M., DOIRON, C., LABROUSSE, M & HOUILLOU, C. 1987. Production of fertile salamanders by transfer of germ cell nuclei into eggs. *Development*, **100**: 471-477.
- LILLIE, F R., 1916. - The theory of the free-martin. *Science*, **43**, 161.
- MINIZ, B., 1962. - Formation of genotypically mosaic mouse embryos. *Am. Zool*, **2**, 432
- PLACAIS, D., 1974. Transplantation d'une tumeur spontanée découverte chez l'amphibien urodèle, *Pleurodeles waltli* Michah. *Bull. Soc. zool Fr.*, **99** 283-295
- ROUX W. 1895. Über die verschiedene Entwicklung isolierter erster Blastomeren. *Roux's Arch Entw.* **1** 596
- SIGNORIET J & PICHÉRAL B. 1962. Transplantation de noyaux chez *Pleurodeles waltli* Michah. *C r Acad Sci Paris*, **254** 1150-1151
- SPEMANN H. 1901. Ueber Korrelationen in der Entwicklung des Auges. *Verh Anat Ges.* **15** 61-79
- 1921. Die Erzeugung tierischer Chimeren durch heteroplastische embryonale Transplantation zwischen *Triton cristatus* und *taenarius*. *Roux's Arch Entw.*, **48**, 533-570
- TARKOWSKI, A. K. 1961. Mosaic chimaeras developed from fused eggs. *Nature* **190** 857-860

Corresponding editor Alain DUBOIS



## Une nouvelle espèce de *Wolterstorffina* (Amphibia, Anura, Bufonidae) de l'étage afro-subalpin du Mont Okou (Cameroun)

R. BOISTEL\*<sup>1</sup> & J.-L. AMIET\*\*

\* Laboratoire de Biogéographie et Ecologie des Vertébrés,  
Ecole Pratique des Hautes Études, Université de Montpellier II,  
Case postale 094, 34095 Montpellier Cedex, France

\*\* 48 rue des Soucheres, 26110 Nyons, France

**A new species of *Wolterstorffina* is described from Mount Oku (Cameroun). It is readily distinguished from the previously known species, *W. parvipalmata* and *W. mirei*, by its medially smooth but laterally warty dorsum, the thickened external edge of the foot and the largest size. The new species is probably an endemic species of the Mount Oku afro-subalpine zone.**

### INTRODUCTION

Un caractère remarquable de la faune bufonidienne d'Afrique est le nombre élevé de genres mono- ou paucispécifiques orophiles. Actuellement au nombre d'une dizaine (d'après la classification proposée par DUBOIS, 1987), ces genres sont endémiques de systèmes orographiques plus ou moins étendus, allant de l'Afrique occidentale à l'Éthiopie et à l'Afrique australe, et présentent pour la plupart des modes de reproduction originaux.

Cette diversification générique a été particulièrement marquée sur la Dorsale camerounaise, qui abrite à elle seule trois de ces genres : *Werneria*, *Dubnanampus* et *Wolterstorffina*.

Ce dernier a été créé il y a soixante ans (MIRTHINS, 1939) pour *Nectophryne parvipalmata* Werner, 1898, car il ne présente pas les lamelles plantaires et palmaires caractéristiques de *Nectophryne* *afra* Buchholz et Peters, 1875 et *Nectophryne hutesni* Boulenger, 1913. Une seconde espèce, initialement attribuée au genre *Nectophryne*, s'y est ajoutée ensuite *Wolterstorffina mirei* (Perret, 1971). Entretemps, une espèce d'Afrique centrale, *Wolterstorffina parkeri* Laurent, 1950, avait été transférée dans le genre *Laurentophryne* par THUR (1960).

Grâce aux recherches de M. Laurent Chirio, qui nous avait soumis pour identification deux spécimens récoltés sur le Mont Okou, le genre s'enrichit à présent d'une troisième espèce

<sup>1</sup> Correspondance : Université Pierre et Marie Curie, Centre scientifique d'Orsay, Laboratoire des Mécanismes de Communication, Bâtiment 446, 91405 Orsay Cedex, France

Par leur habitus, ces spécimens ressemblent en effet beaucoup plus à *Wolterstorffina parvipalmata* et *W. mirei* qu'à tout autre bufonide du Cameroun. Ce rapprochement est confirmé par leurs caractères ostéologiques, qui correspondent à ceux retenus par GRANDISON (1978) pour définir le genre *Wolterstorffina* (huit vertèbres indépendantes presacrales proœales, extrémité des phalanges terminales élargie en spatule, humérus des mâles adultes avec *crista medialis* et *lateralis* élargies, palatin présent, columelle et trompe d'Eustache absentes). Plusieurs caractères montrent toutefois qu'ils ne peuvent être rapportés à aucune des deux espèces déjà connues, et en particulier à *W. mirei*, qui en est pourtant sympatrique sur le Mont Okou.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

En plus des deux spécimens déjà mentionnés, nous avons pu disposer du matériel recueilli par M. Lamotte lors d'une mission effectuée au Cameroun en 1976.

Par ailleurs, nous avons examiné à titre comparatif des individus de *W. mirei* et *W. parvipalmata*, déposés, comme ceux de la nouvelle espèce, au Laboratoire des Reptiles et des Amphibiens du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris (MNHN). En voici les références.

(1) *Wolterstorffina mirei*: 1 femelle, MNHN 1991.4935, Mts. Bamboutos, 7.7 76, rec. M. Lamotte, 2 femelles, MNHN 1999.6393-6394, Mts. Bamboutos, prairie, 2500 m, réc. L. Chirio, 1 mâle, MNHN 1999.6398, Mts. Bamboutos, prairie, 2700 m, 22 9 71, rec. et coll. J.-L. Amiet (JLA 71 128), 1 femelle, MNHN 1999 6399, Mts. Bamboutos, prairie, 2400-2500 m, 26 5 75, réc. et coll. J.-L. Amiet (JLA 75 228); 1 juvénile, MNHN 1999 6400, Mts. Bamboutos, sous une pierre en prairie, 2400-2500 m, 17 7.70, rec. et coll. J.-L. Amiet (JLA 70 238).

(2) *Wolterstorffina parvipalmata*: 1 mâle, MNHN 1999.6395, Mofako, près d'un ruisseau, 1100 m, 26 11.81, réc. et coll. J.-L. Amiet (JLA 81 195); 1 femelle, MNHN 1999 6396, Kala, forêt près d'une rivière, 800 m, 21 9.74, réc. et coll. J.-L. Amiet (JLA 74.275), 1 juvénile, MNHN 1999 6397, Kala, forêt près d'une rivière, 800 m, 6 2.71, réc. et coll. J.-L. Amiet (JLA 71.100).

Des diapositives et des spécimens de la collection d'un des auteurs (JLA) ont également été utilisés, pour comparaison avec le matériel mentionné ci-dessus.

### *Wolterstorffina chirioi* n. sp.

*Holotype* MNHN 1999.6391, femelle adulte (museau-anus 40.1 mm), trouvée sous une pierre au sommet du Mont Okou (6°14'N, 10°26'E), à 3000 m d'altitude, en juin 1998, par L. Chirio. Habitus: voir fig. 1. Mensurations: voir tab. 1.

*Paratypes* (1) MNHN 1999 6392, femelle adulte (museau-anus 44.1 mm), recueillie au même endroit et à la même date que l'holotype; (2) MNHN 1991 4928, femelle adulte (museau-anus 41.9 mm), MNHN 1991 4929, femelle adulte (museau-anus 40.1 mm), MNHN 1999 4930, femelle adulte (museau-anus 36.4 mm), MNHN 1999 4931 mâle adulte (museau-anus 31.3 mm), MNHN 1999 4932, mâle adulte en mauvais état (museau-anus

Tab. 1 – Mensurations de l'holotype (astérisque) et des paratypes de *W. chirio*, à la précision de 0,1 mm. AB, longueur de l'avant-bras; C, longueur de la cuisse. IN, espace internasal, IP, espace interpalpébral; J, longueur de la jambe. L, longueur museau-anus; LT, longueur de la tête; M, longueur de la main, O, diamètre de l'œil, ON, distance angle palpébral antérieur – narine, P, longueur du pied; T, largeur de la tête

	1999.6391*	1999.6392	1991.4928	1991.4929	1991.4930	1991.4931
L	40,1	44,1	41,9	40,1	36,4	31,3
LT	11,3	12,5	12,4	12,3	11,4	9,8
T	11,3	11,6	11,6	11,7	11,4	10,1
ON	3,3	3,5	3,3	3	3	2,9
O	3,8	3,6	3,66	3,76	3,33	2,9
IP	4,7	4,5	4,8	4,9	4,4	3,7
IN	2,56	2,5	2,6	2,5	2,5	2,4
AB	9,9	9,8	9,5	9,9	9,1	8,7
M	10,5	11,2	10,8	10,9	10,3	9,5
C	14	15	13,9	14,2	13,3	12,9
J	13,8	13,7	13,7	13,8	13,3	13
P	16,1	17,8	17,1	16,8	15,8	16

31,2 mm), MNHN 1999.4933, juvénile (museau-anus: 14 mm) et MNHN 1999.4934, femelle adulte en mauvais état (non mesurée), Mont Okou, 10/11/75, rec. M. Lamotte.

*Diagnose.* – Espèce appartenant au genre *Wolterstorffina*, distincte de ses congénères par (1) sa grande taille, (2) son tégument lisse sur le dos mais verruqueux-granuleux, avec des spinules noires, sur les flancs et sur les épaules, (3) la tranche externe de ses pieds fortement épaissie, et (4) l'absence de sillon cutané marqué entre les régions gulaire et pectorale. Elle se sépare aussi de *W. parvipalmata* par son museau moins pointu et moins saillant et ses paupières supérieures non tuberculées, et de *W. murei* par sa fente cloacale moins nettement orientée vers le bas.

*Étymologie.* – L'espèce est dédiée à M. Laurent Chirio, Inspecteur pédagogique de Sciences naturelles actuellement en poste à Bafoussam (Cameroun), pour consacrer l'efficacité de son activité herpétologique et batrachologique en Afrique.

#### *Description.*

*Habitus.* – *W. chirio* est remarquable par sa grande taille (mâles: 30-31 mm, femelles: 41-44 mm), nettement supérieure, pour les deux sexes, à celle de *W. parvipalmata* (mâles: 24-27 mm, femelles: 30-35 mm, exceptionnellement 37-39 mm chez des femelles du Massif de Yaoundé) ou, au moins pour les femelles, à celle de *W. murei* (mâles: 32-36 mm, femelles: 35-39 mm). Sa stature est modérément élancée, moins svelte que chez *W. parvipalmata* mais plus que chez *W. murei* (les spécimens de Chirio, voir fig. 1, sont plus sveltes que ceux de Lamotte, probablement en raison d'un jeûne prolongé). Les membres sont longs et relativement minces, sauf les mains et surtout les pieds, qui contrastent avec les autres segments par leur aspect massif, chez les mâles, la musculature des bras et des avant bras est hypertrophiée. Comme

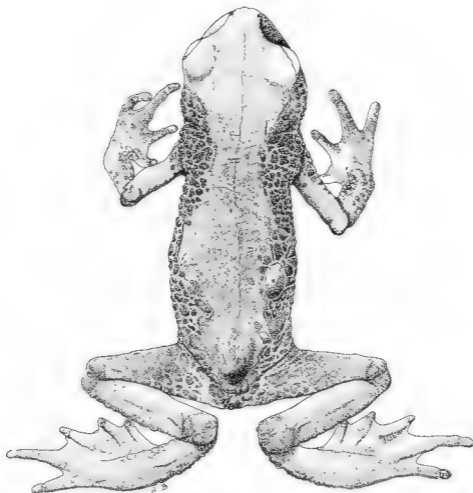


Fig 1 - *Wolterstorffina chirui* Holotype, MNHN 1999 6391, en vue dorsale (dessin R. Borstel)

chez les autres espèces de *Wolterstorffina*, la tête, large, est séparée du corps par un rétrécissement collaire situé en avant de la région scapulaire.

*Tégument.* - Un des caractères distinctifs majeurs de *W. chirui* reside dans la différence d'aspect du tégument de la région dorsale et des flancs. Sur la tête (paupières comprises), entre les épaules et sur toute la région lombo-sacrée jusqu'à l'urostyle, la peau est lisse, d'aspect soyeux. La région postorbitaire est aussi lisse mais munie de petites épines. Au-delà, depuis le rétrécissement collaire jusqu'aux aines, les flancs sont couverts de verrucosités denses et irrégulières, formant un ensemble grossièrement réticulé. Ces excroissances, dans la moitié antérieure des flancs, portent des épines noires qui, fait important, sont présentes dans les deux sexes.

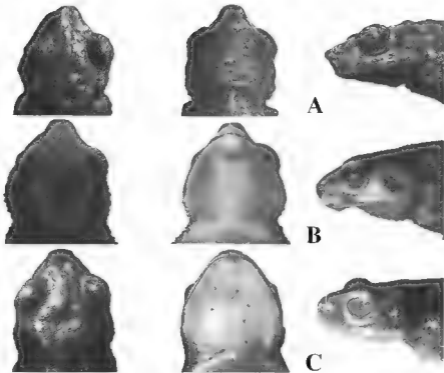


Fig 2 — Tête, en vue dorsale (à gauche), ventrale (au milieu) et latérale (à droite) des trois espèces de *Wolterstorffina*. A, *W. parvipalmata* (MNHN 1999 6396, largeur de la tête 9,5 mm), B, *W. murei* (MNHN 1999 6399, largeur de la tête 10,5 mm), C, *W. chinot* (holotype, MNHN 1999 6391, largeur de la tête 11,3 mm). Remarquer la différence d'aspect du tegument chez les trois espèces, ainsi que la forme caractéristique du museau chez *W. parvipalmata*.

Sur la face ventrale, gorge comprise, la peau est régulièrement granulée-réticulée, le relief cutané pouvant être plus dense et plus saillant sous la région cloacale.

**Tête** — La tête, aussi large que longue, est rétractée en arrière des yeux, en avant de ceux-ci, elle dessine, vue en plan, une courbe assez régulière, à peine interrompue par l'extrémité obtuse-arrondie du museau.

Le museau est court, la distance œil-narine en général inférieure au diamètre de l'œil. Son extrémité, vue de profil, est obtuse, verticalement tronquée ou légèrement saillante en avant de la bouche. La région loréale est verticale et quelque peu concave. Les canthus sont modérément incurvés, non anguleux. Les narines, situées très près du bout du museau, s'ouvrent latéralement, l'espace qui les sépare est inférieur à l'espace œil-narine.

La face supérieure de la tête, museau compris, est plane. L'espace interorbitaire est large, presque double de la plus grande largeur des paupières. Il n'y a ni crêtes cephaliques,

ni glandes parotides, ni tympan, ni replis supra-tympaniques, mais, comme on l'a vu, l'aspect du tégument de la région postorbitaire est bien différent de celui du dessus de la tête.

Ventralement, la région gulaire ne présente pas de caractère particulier, mais il faut relever qu'elle n'est pas séparée de région pectorale par un pli creux, contrairement à ce qui s'observe souvent chez *W. mirei* et toujours chez *W. parvipalmata*.

La langue est allongée, non échancrée à son extrémité. Il n'y a pas de sacs vocaux chez les mâles et pas d'orifices correspondants dans la bouche. Il n'y a pas non plus d'orifices des trompes d'Eustache, ni de dents vomériennes.

**Membres** - Les membres antérieurs sont assez grêles chez la femelle, beaucoup plus épais chez les mâles, en particulier les bras, dont l'humérus est muni d'une haute crête aliforme et dont la musculature est hypertrophiée. La main est grande, la taille relative des doigts correspondant à la formule  $I < II < IV < III$ . Les doigts sont subcylindriques, non (I et II) ou à peine (III et IV) dilatés à leur extrémité, avec un petit sillon dorsal marquant la limite entre l'avant-dernière et la dernière phalange. Ils paraissent largement séparés à leur base et dépourvus de palmure; en fait, comme le montre la fig. 3A, il y a une petite palmure entre I et II et entre II et III, mais celle-ci est fortement épaissie (différence avec *W. parvipalmata*, à palmure plus étendue et plus mince). Chez les deux mâles dont nous disposons, il n'y a pas de callosités nuptiales. Le tégument de la face palmaire a une texture à peu près lisse, sans granulations ni réticulation. Les tubercules sous-articulaires sont massifs, peu saillants et mal délimités: il y en a un, basal, aux doigts I et II, et deux aux doigts III et IV. A la base de la main, il y a un tubercule métacarpien, ovale-arrondi et peu saillant.

Comme chez les autres *Wolterstorffina*, les membres postérieurs sont élancés mais paraissent relativement minces, en raison de la faible musculature des cuisses mais aussi du contraste résultant du grand développement du pied (fig. 1). Celui-ci, par sa largeur, son aspect massif et le grand développement de la palmure, est nettement différent de celui des deux autres espèces. La taille relative des orteils, du plus petit au plus grand, est donnée par la formule  $I < II < V < III < IV$ . L'extension de la palmure ressort de la formule suivante (selon MYERS & DULLMAN, 1982).  $10 - 0 \text{ II } 0 - 0 \text{ III } 0 - 3 \text{ IV } 3 - 1 \text{ V}$ . Les orteils les mieux dégagés de la palmure, le IV et le V, ont un aspect boudiné. L'extrémité des orteils est arrondie, non dilatée (sauf, très légèrement, pour le V) et, dorsalement, un sillon marque la dernière articulation. Le tégument plantaire est semblable à celui de la main. En dehors des pelotes terminales, peu saillantes, il est à peu près impossible de reconnaître des dilatations correspondant à des tubercules sous-articulaires. Les tubercules métatarsiens interne et externe, peu ou à peine saillants, sont mal différenciés.

Une particularité remarquable du pied, non apparente sur les figures 1 et 3A, est l'épaississement de sa tranche externe, qui a un aspect boursoufflé. Ce caractère n'est visiblement pas dû à un artefact de fixation et n'est pas lié au sexe. Comme on peut le constater sur la fig. 3A, il s'accompagne d'une extension de la pigmentation foncée dorsale à la région plantaire externe.

**Ostéologie** - Les caractères du squelette ont pu être étudiés à partir d'une radiographie aux rayons X effectuée par M. Gasc, et dont l'interprétation nous a été facilitée grâce à l'aide de M. Hoyos (fig. 4). Les points suivants doivent être relevés.

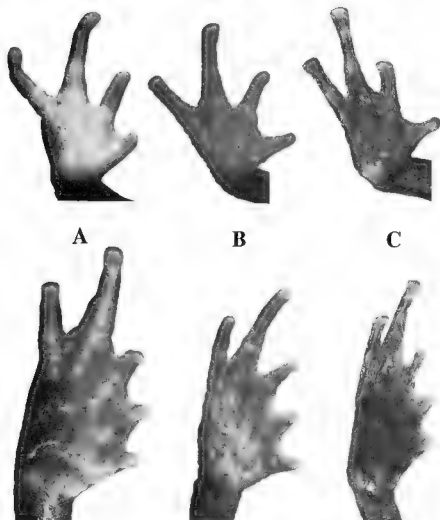


Fig 3 Aspect de la face palmaire (en haut) et plantaire (en bas) des trois espèces de *Walterstrophus*. A. *W. chiria* (holotype MNHN 1999 6391 main 10,5 mm, pied 16,1 mm) B. *W. murei* (MNHN 1999 6399, main 10 mm, pied 15 mm) C. *W. parvipalmata* (MNHN 1999 6396 main 9,5 mm, pied 14 mm) On notera l'extension de la pigmentation foncée dorsale sous la tranche externe du pied chez *W. chiria*

- (1) Squelette cephalique : columelle absente, palatin bien développé, vomers apparemment absents; quadratejugal réduit, séparé et "articulé", complexe sphénoethmoïde ossifié
- (2) Squelette axial : huit vertèbres presacrées proœales, première (cervicale) et seconde vertèbres presacrées non fusionnées, sacrum et coccyx non fusionnés. Ce dernier caractère est en contradiction avec PIRRI (1972) et GRANDISON (1978), mais il s'agit peut-être d'un lapsus

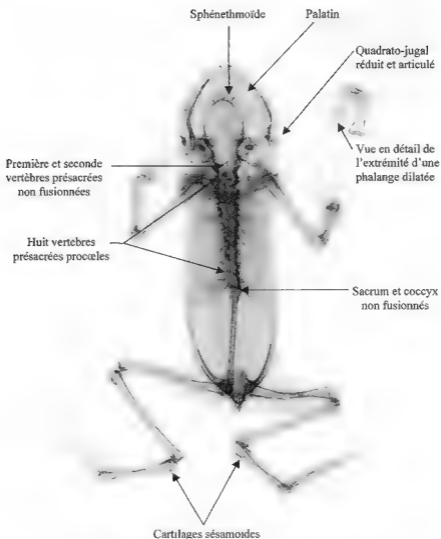


Fig. 4 - Radiographie de l'holotype de *W. churui* (radiographie J.-P. Gasc)

du premier repris par la seconde, car la radiographie de *W. murei* publiée par Perret semble montrer un sacrum et un coccyx non fusionnés.

(3) Ceinture pectorale omosternum absent; sternum entièrement cartilagineux.

(4) Membres chez le mâle, *crista medialis* de l'humérus hypertrophiée, en forme de lame, extrémité des phalanges spatulées aux mains et aux pieds, cartilages sésamoïdes présents.



*Coloration en alcool.* Les spécimens fixés ont un aspect beaucoup plus sombre que ceux de *W mirei* car la teinte foncière du dos est marron foncé, alors que la spinosité est noire. Il peut y avoir sur les flancs et les membres des taches rondes ou oblongues d'un beige jaunâtre clair ou des macules éclaircies diffuses sur les cuisses et les bras et la partie postérieure du dos. La lèvre supérieure peut aussi être éclaircie. Aucun des individus examinés ne présente de maculation transversale sur les membres (caractère au contraire très fréquent chez *W parvipalmata*: fig. 5b) La face ventrale est d'un blanc jaunâtre uniforme ou avec des macules brunâtres sous les membres et une suffusion brune sous la gorge. Chez le juvénile, le dessous est beige marron avec de petites taches blanches.

*Dimorphisme sexuel.* Les mâles n'ont pas de sac vocal et de fentes vocales, ni de coussinets nuptiaux (du moins chez les deux spécimens examinés) Ils peuvent cependant être aisément distingués des femelles par leur taille plus faible, et surtout par leurs membres antérieurs plus robustes, à humérus pourvu d'une crête aliforme (*crista medialis*). Il faut aussi souligner que les testicules, non pigmentés, sont particulièrement volumineux, caractère que PIRRETT (1972) signale aussi chez *W mirei* et *W. parvipalmata*, et qui pourrait être propre au genre.

*Distribution et écologie.* - *W. chirioi* n'a été trouvée que sur le Mont Okou. Compte tenu de son écologie (voir ci-après), il est probable que l'espèce est endémique de ce massif.

Culminant à 3011 m, le Mont Okou (ou Oku) est le second sommet de la Dorsale camerounaise après le Mont Cameroun (4095 m). La Dorsale camerounaise est un ensemble de hauts plateaux et de montagnes, souvent volcaniques et d'altitude supérieure à 2000 m, qui jalonnent un système de failles, orienté SSW-NNE, la "ligne du Cameroun" Exception faite des monts Mandara, qui en sont nettement séparés, la Dorsale s'étire sur plus de 600 km; dans sa partie centrale, des chaînons transversaux lui confèrent une largeur maximale de l'ordre de 200 km Malgré son altitude, le Mont Cameroun est isolé de la masse principale de la Dorsale, dont le noyau correspond au Mont Okou Celui-ci, bien que d'origine volcanique, n'a plus d'activité, contrairement au Mont Cameroun.

Si l'on adopte la succession d'étages reconnue par Letouzey, dans la *Notice* de sa carte phytogéographique du Cameroun (LETOUZEY, 1986), le Mont Okou est le seul sommet de la Dorsale (Mont Cameroun excepté) qui atteigne l'étage afro subalpin Toutefois, la zone correspondant à cet étage a une amplitude restreinte, puisque sa limite inférieure se situe, d'après le même auteur, vers 2800 m

A ce niveau, la végétation est essentiellement herbacée, avec des prairies à *Sporobolus* comprenant divers orophytes, dont quelques espèces sont caractéristiques de l'étage Cette végétation a probablement une origine au moins en partie anthropique, car les troupeaux des pasteurs Bororos pâturent jusqu'au sommet LETOUZEY (1986) signale l'existence, dans la région culminale, de taillis arbustifs, de lambeaux forestiers et même de "taches importantes" de forêt de *Podocarpus* sur le versant nord ces formations doivent représenter les vestiges d'une végétation forestière autrefois plus étendue qu'à présent

L'altitude à laquelle ont été capturés les spécimens de Lamotte n'est pas connue, mais ceux de *Chirio* ont été trouvés à 3000 m, donc presque au sommet En se fondant sur ce que l'on sait de la batrachofaune d'autres massifs camerounais (MERTENS, 1938, AMIET, 1975, 1980, 1987), on peut raisonnablement avancer que la présence de *B. chirioi* est liée à celle de



Fig. 5 Deux espèces de *Walterstottina* photographées sur le vif: a. *W. nana*, mâle des Monts Bamboatos, juillet 1974 b. *W. parvipalmata*, femelle du Mont Kala, près de Yaoundé, 21 décembre 1970. Les excroissances des paupières supérieures de *W. parvipalmata* et la dilatation humérale du mâle de *W. nana* sont bien visibles (photos J.-L. Amiet)

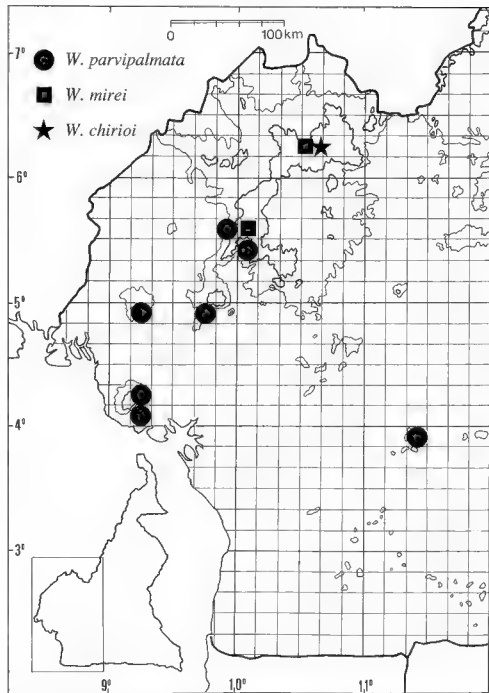


Fig. 6. Carte du sud-ouest du Cameroun montrant la distribution des trois espèces de *Wolterstorffina*. Trame quadrillée à 10 minutes sexagésimales, courbes de niveau de 900 et 1500 m.

l'îlot d'étage afro-subalpin, ce qui n'exclut pas qu'elle puisse en transgresser la limite inférieure. Des recherches ultérieures devront préciser quelles autres espèces d'anoures lui sont associées, et surtout quels sont ses rapports spatiaux avec *W. mirei*. Cette espèce, abondante sur le Mont Méléan dans le massif des Bamboutos, entre 2400 et 2700 m, a été en effet décrite sur des spécimens récoltés par l'entomologiste P. Bruneau de Mire sur le Mont Okou vers 2500 m d'altitude (d'après PERRET, 1971)

On remarquera que les trois espèces de *Wolterstorffina* se succèdent verticalement suivant un schéma assez semblable à celui que montrent d'autres anoures orophyles du Cameroun (AMET, 1980):

(1) *W. parvipalmata* est répandue dans l'étage submontagnard sur les flancs sud et ouest de la Dorsale mais descend assez nettement en-dessous de la limite inférieure de cet étage et atteint le massif de Yaoundé (espèce "paramontagnarde"), où elle subsiste, comme relicté paléoclimatique, dans la frange supérieure de l'étage collinéen (AMET, 1987):

(2) *W. mirei* peuple la partie supérieure de l'étage afro-montagnard (environ 1800-2800 m) des massifs centraux de la Dorsale;

(3) *W. chirioi* n'est connue que de la partie inférieure de l'étage afro-subalpin du Mt Okou

#### CLÉ D'IDENTIFICATION DES GENRES DE BUFONIDAE DU CAMEROUN ET DES ESPÈCES DU GENRE *WOLTERSTORFFINA*

- |  |                            |
|--|----------------------------|
| 1. Glandes parotides et tympanes présents; tégument dorsal fortement verruqueux (sauf chez <i>B. superciliaris</i> ) .....   | <i>Bufo</i>                |
| 1'. Ni glandes parotides ni tympanes .....   | 2                          |
| 2. Tégument dorsal lisse, pieds normaux, à palmure peu développée (sauf chez les mâles en livrée nuptiale de <i>Werneria bambutensis</i> ) .....                                       | <i>Werneria</i>            |
| 2'. Un relief tégumentaire plus ou moins accusé, au moins sur certaines parties du corps et des membres, pied présentant des caractères particuliers ou, au moins, largement palmés .. | 3                          |
| 3. Pieds et mains étroits, d'aspect atrophé: seulement 4 orteils, les doigts et orteils I et IV réduits; taille faible (18-24 mm) .....  | <i>Dulynampus</i>          |
| 3'. Cinq orteils et quatre doigts, pieds largement palmés .....  | 4                          |
| 4. Des lamelles transversales sous les orteils et les doigts, pieds et mains largement palmés, taille petite (18-25 mm) .....  | <i>Nectophryne</i>         |
| 4'. Pas de lamelles sous les doigts et les orteils, seuls les pieds sont largement palmés (25-40 mm) .....   | <i>Wolterstorffina</i> (5) |
| 5. Extrémité du museau saillante, dépassant nettement la bouche, paupières supérieures fortement verruqueuses, main avec une palmure interdigitale .....                               | <i>W. parvipalmata</i>     |
| 5'. Extrémité du museau non ou à peine saillante; paupières supérieures non ou à peine verruqueuses; palmure interdigitale petite ou absente .....                                     | 6                          |
| 6. Tégument dorsal lisse, la région scapulaire et les flancs avec des excroissances spinuleuses; tranche externe des pieds épaissie, d'aspect boursoufflé .....                        | <i>W. chirioi</i>          |
| 6'. Tégument dorsal verruqueux, tranche externe des pieds non épaissie .....   | <i>W. mirei</i>            |

## RÉSUMÉ

Une nouvelle espèce de *Wolterstorffina*, *W. chirioi*, est décrite du Mont Okou (Cameroun). Elle se distingue des deux autres espèces déjà connues, *W. parvipalmata* et *W. mirei*, par plusieurs caractères (par exemple, son tegument lisse sur le dos mais verruqueux-spinuleux sur les flancs et les épaules, la tranche externe de ses pieds fortement épaissie, sa taille plus grande, etc.). *W. chirioi* est probablement une espèce endémique de l'étage afro-subalpin du Mont Okou.

## REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre gratitude d'abord à M Laurent Chirio, dont les captures ont été à l'origine de ce travail, ainsi qu'à Madame Annemarie Ohler et MM Alain Dubois, Jean-Pierre Gasc, Stéphane Grosjean, Julio Mario Hoyos, Maxime Lamotte, Olivier Pauwels et Jean-Luc Perret qui, à des titres divers, nous ont apporté leur aide et ont ainsi contribué à sa réalisation.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMIET, J.-L. 1975. Ecologie et distribution des Amphibiens Anoures de la région de Nkongsamba (Cameroun) *Ann. Fac. Sci. Yaounde*, **20**: 33-107
- 1980. Révision du genre *Leptodactylodon* Andersson (Amphibia, Anura, Astylosterninae) *Ann. Fac. Sci. Yaounde*, **27**: 69-224.
- -- 1987. Aires disjointes et taxons v. c. variants chez les Anoures du Cameroun: implications paléoclimatiques. *Alytes*, **6** (3-4): 99-115
- BOLLINGER, G. A. 1913. On the presence of two closely allied species of toads of the genus *Nectophryne* in Cameroon. *Ann. Mag. Nat. Hist.*, **12**: 70-72
- DUBOIS, A. 1987. Miscellanea taxonomica batrachologica (I) *Alytes*, "1986", **5** (1-2): 7-95
- GRANDISON, A. G. C. 1978. The occurrence of *Nectophrynoides* (Anura, Bufonidae) in Ethiopia. A new concept of the genus with a description of a new species. *Monit. Zool. Ital.* (n.s.), **11**, suppl.: 119-172
- 1981. Morphology and phylogenetic position of the West African *Dulonampus spoeckedi* Andersson, 1903 (Anura Bufonidae). *Monit. Zool. Ital.* (n.s.), **15**, suppl.: 187-215
- LAURENT, R. F. 1950. Diagnoses préliminaires de treize Batraciens nouveaux d'Afrique centrale. *Rev. Zool. Bot. Afr.*, **44** (1): 1-18
- LUTOZIL, R. 1986. Notice de la carte phytogéographique du Cameroun au 1:500 000 (1985). Toulouse, Institut de la Carte internationale de la Végétation: 1-240
- MERTINS, R. 1938. Herpetologische Ergebnisse einer Reise nach Kamerun. *Abh. Senckenb. naturf. Ges.*, **442**: 1-52
- 1939. Über das Höhenvorkommen der Froschlurche am Großen Kamerun-Berge. *Abh. Mus. nat. Vorgesch. Magdeburg*, **11**: 121-128
- MYERS, C. W. & DULLMAN, W. E. 1982. A new species of *Hyla* from Cerro Colorado, and other tree-frogs records and geographical notes from western Panama. *Am. Mus. Novit.*, **2752**: 1-25
- PERRET, J.-L., 1971. - Les espèces du genre *Nectophrynoides* d'Afrique (Batraciens Bufonides) *Ann. Fac. Sci. Cameroun*, **6**: 99-109
- 1977. Les espèces des genres *Wolterstorffina* et *Nectophrynoides* d'Afrique (Amphibia, Bufonidae) *Ann. Fac. Sci. Cameroun*, **11**: 93-119

- PETERS, W., 1875 - Über die von Herrn Professor Dr R. Buchholz in Westafrika gesammelt Amphibien. *Monatsh. preuss. Akad. Wiss. Berlin*, **1875** 196-212.
- THOMAS, J. A., 1960 - Two new genera of African bufonids, with remarks on the phylogeny of related genera. *Copeia*, **1960** 225-233.
- WERNER, F., 1898 - Über Reptilien und Batrachier aus Togoland, Kamerun und Tams II *Verh. Zool. Bot. Ges. Wien*, **48** 191-231

*Corresponding editor:* Alain DUBOIS.

## A new species of tree frog (Anura, Hylidae, *Litoria*) from the mountains of Irian Jaya, Indonesia

Stephen J. RICHARDS\*<sup>1</sup> & Djoko T. ISKANDAR\*\*

\* School of Tropical Biology, James Cook University,  
Townsville, Queensland 4811, Australia

\*\* Laboratory of Biosystematics and Genetics, Jurusan Biologi,  
Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Institute of Technology,  
Bandung 10, Jalan Ganesa, Bandung 40132, Indonesia  
[jskandar@bi.itb.ac.id]

**A new species of hylid frog is described from lower montane rainforest (1070 m elevation) in the headwaters of the Wapoga River, Irian Jaya. The new species shows affinities to some members of the *Litoria nigropunctata* species-group but can be distinguished from all described species in that group by a combination of dark brown colouration on the hidden surfaces of the thighs, groin and axilla, and dorsal colouration which consists (in life) of small yellow spots on a uniform green background. The advertisement call is a short, distinctly pulsed note lasting about 0.2 second, with a dominant frequency of about 2.5 kHz.**

### INTRODUCTION

The Australopapuan hylid frog genus *Litoria* reaches its greatest diversity in Australia and mainland New Guinea (FROST, 1985). Although the genus is relatively well documented in Australia (BARKLER et al., 1995), the New Guinea fauna remains poorly known. This is particularly true for the Indonesian province of Irian Jaya where fauna surveys have lagged behind those in neighbouring Papua New Guinea (ALLISON & DWYAHRENI, 1997).

Ten small green *Litoria* species have been reported from the mountains of New Guinea. MINZIES (1993) included six of these (*Litoria chloronota*, *L. iris*, *L. havana*, *L. leucova*, *L. mucro* and *L. ollauri*) in the *Litoria nigropunctata* species-group, which was defined (in part) by TYLER & DAVIES (1978) as "small to medium species with short, 1/3-webbed fingers and almost fully webbed toes. Predominantly green in life and may be marked with gold and black". JOHNSTON & RICHARDS (1994) subsequently redefined *L. leucova* and suggested that it may be related to torrent-dwelling frogs of the *L. becki* species-group of TYLER & DAVIES (1978). They described an additional member of the *L. nigropunctata* group, *Litoria majkithise*, from the foothills of the Star Mountains.

1. Current address: Vertebrate Department, South Australian Museum, North Terrace, Adelaide, S.A. 5000, Australia  
Richards.Steve@sau.gov.au

*Litoria contrastens* is a montane representative of the predominantly lowland *Litoria bicolor* species-group, and two other small green *Litoria*, *L. bulmeri* and *L. longicrus*, are torrent-dwelling frogs that live along steep mountain streams (S. J. Richards, personal observations). TYLER & DAVIES (1978) placed *L. bulmeri* in a monotypic species group and, based solely on morphological characters, erroneously included *L. longicrus* in the *L. bicolor* species group. Two of these species have been reported from Irian Jaya. *Litoria iris* is widespread along the central mountainous spine of New Guinea, reaching its western limit in the Star Mountains in Irian Jaya (TYLER, 1968). *Litoria chloronota* is endemic to Irian Jaya, being known only from the Arfak Mountains on the Vogelkop Peninsula (TYLER, 1968; MENZIES, 1993).

During a biodiversity survey in the mountainous headwaters region of the Wapoga River, Irian Jaya (MACK & ALONSO, 2000), we collected eight specimens of an undescribed, small green treefrog showing some affinities with the *Litoria nigropunctata* species-group (TYLER & DAVIES, 1978). Here we describe the new species and provide information on its advertisement call and natural history.

#### MATERIAL AND METHODS

Specimens are deposited in the Museum Zoologie Bogoriense (MZB), Indonesia, and the South Australian Museum (SAMA), Australia. Additional specimens examined for comparisons (see list in app. 1) are in the British Museum (BM) and the Natural Sciences collection of the University of Papua New Guinea (UP). Measurements (to the nearest 0.1 mm) were taken with dial callipers and a stereomicroscope fitted with an ocular micrometer, and follow MENZIES (1993). They are SVL (snout-vent length), TL (tibia length), HW (head width at tympanum), HL (head length from tip of snout to posterior edge of tympanum), EYE (horizontal eye diameter), TYM (horizontal tympanum diameter), IN (inter-narial distance), EN (distance between anterior edge of eye and posterior edge of naris), 3FD (horizontal diameter of 3<sup>rd</sup> finger disc) and 3FP (narrowest horizontal width of 3<sup>rd</sup> finger penultimate phalanx), 4TD and 4TP (4<sup>th</sup> toe disc and penultimate phalanx, as for 3<sup>rd</sup> finger). For measurements and proportions, the mean ( $\bar{x}$ ) is given below followed by the standard deviation ( $s$ ) and the range.

Calls were recorded with a Sony Professional Walkman tape recorder and SMZ-200 microphone, and were analysed with the sound analysis program Avisoft SAS-Lab Pro.

#### RESULTS

##### *Litoria wapogaensis* sp. nov. (fig. 1-6)

*Holotype* MZB Amp 3873, adult male, collected at Wapoga Alpha exploration camp (136°34.423'E, 3°08'687"S, 1070 m elevation) in the headwaters of the Wapoga River, Irian Jaya Province, Indonesia, on 12 April 1998, by S. Richards & D. Iskandar.



*Paratypes.* - MZB Amp.3874-3875, SAMA R.54595-54598, adult males collected at the same locality as the holotype on 9 April 1998; MZB Amp.3876, adult male collected at the same locality as the holotype on 15 April 1998

*Diagnosis.* - A small *Litoria* (males 30.5-32.9 mm SVL) characterised by: (1) snout broadly rounded in dorsal view and bluntly rounded in lateral view, (2) canthus rostralis poorly defined, gently rounded and straight or slightly curved; (3) vomerine teeth present; (4) fingers one half webbed; (5) dorsum (in life) green with small yellow spots; (6) axilla, groin and hidden surfaces of thighs deep purplish brown; and (7) advertisement call a single, distinctly pulsed note.

*Description of holotype.* - Head moderately slender (HW/SVL 0.35), head about as wide as long (HL/HW 1.02), slightly more than one-third body length (HL/SVL 0.35). Snout broadly rounded in dorsal view, bluntly rounded in lateral view (fig. 1, 3). Dorsal one-fifth of tympanum obscured by gently curving supratympanic fold that extends from posterior edge of eye half-way to point of arm insertion. Eye relatively large, prominent (EYE/SV 0.123). Canthus rostralis poorly defined, gently rounded, slightly curved, loreal region slightly concave. Vomerine teeth in two raised patches between choanae, vocal slits present. Tongue broadly cordiform.

Limbs slender. Fingers short, outer fingers one-half webbed; relative lengths of fingers III > IV > II > I, terminal discs large, prominent (3FP/3FD 0.64). Subarticular tubercles distinctly bi-lobed. Brown nuptial pad on each thumb. Legs moderately long (TL/SVL 0.59). Toes nearly fully webbed, web reaching base of disc except on 4<sup>th</sup> toe where webbing reaches penultimate tubercle and continues as fringe along toe to base of disc. Toe discs large, prominent (4FP/4FD 0.69). Relative lengths of toes IV > III = V > II > I. Subarticular tubercles on toes 3-5 bi-lobed.

Dorsum very finely striated (nearly smooth), without tubercles on head or body. Ventral surface finely granular on throat, coarsely granular on belly. Large white tubercles on ventral surface of thighs.

*Colour in life.* - Dorsally uniform green with scattered, small yellow spots, narrow, pale yellow stripe around upper jaw. Ventral surfaces white. Axilla, groin and posterior of thigh deep purplish brown.

*Colour in preservative.* - Dorsally pale blue with small white spots, a faint white stripe around upper jaw. Pigmentation in axilla, groin and posterior of thigh dark brown. Brown pigment on legs sharply delineated from blue dorsal colouration of limbs by two narrow strips of black and brown pigmentation. Blue pigmentation on arms terminating abruptly in clearly demarcated line at wrist. Pigment on hands restricted to fine brown stippling on dorsal surfaces of 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> fingers, extremely sparse on 2<sup>nd</sup> finger. Plantar surfaces with scattered brown pigmentation.

*Measurements (mm) of holotype.* - SVL 30.7; TL 18.2; HW 10.6; EYE 3.8; EN 3.0; IN 3.8; TYM 1.6; 3FD 1.7; 3FP 1.1; 4FD 1.6; 4FP 1.1.

*Variation.* - There are seven paratypes, all adult males (SVL 30.5-32.9 mm). Dorsal colouration of all specimens is pale to dark blue (green in life) with scattered small white (yellow in life) spots. In some specimens a few spots are very pale blue (pale, yellowish green in life).

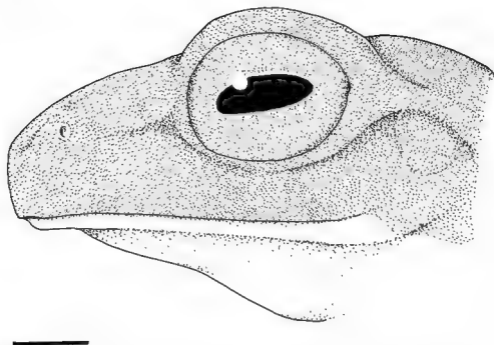


Fig. 1. Lateral view of the head of *Litoria wapogaensis*, paratype (SAMA R54595) Scale bar = 2 mm

and several specimens have very small, intensely dark blue (dark green in life) spots concentrated laterally. The dark brown colouration of the concealed surfaces of the thighs and axilla is a conspicuous feature of all specimens and is retained in preservative. All paratypes have a prominent short, raised white ridge below the vent, a feature that is poorly developed in the holotype. In two of the paratypes (SAMA R54596 and 54598), the vomerine teeth are poorly developed.

*Measurements (mm) and proportions of the six paratypes:  $\bar{x} \pm s$  range.* SVL 31.85  $\pm$  0.91, 30.5-32.9; TL 18.1  $\pm$  0.51, 17.4-19.0; HW 10.97  $\pm$  0.25, 10.5-11.1; EYE 3.81  $\pm$  0.21, 3.5-4.1; EN 2.95  $\pm$  0.17, 2.7-3.2; IN 3.81  $\pm$  0.16, 3.6-4.0; TYM 1.53  $\pm$  0.05, 1.5-1.6; 3FP 1.05  $\pm$  0.12, 0.9-1.3; 3FD 1.71  $\pm$  0.21, 1.4-2.0; 4TP 1.0  $\pm$  0.15, 0.8-1.2; 4TD 1.52  $\pm$  0.18, 1.3-1.7; TL/SVL 0.56  $\pm$  0.02, 0.53-0.59; EYE/SVL 0.12  $\pm$  0.008, 0.1-0.13; EN/IN 0.77  $\pm$  0.05, 0.71-0.88; 3FP/3FD 0.62  $\pm$  0.06, 0.55-0.71; 4IPI/4FD 0.65  $\pm$  0.06, 0.58-0.75

*Advertisement calls.* We recorded 28 calls from three specimens. Two different calls were produced. The most frequently produced call (78.6% of total), and the one that we presume to be the advertisement call, was a single distinctly pulsed note emitted at irregular intervals (fig. 5; tab. 1). The mean length of 22 calls was 0.20 s ( $s = 0.03$ , range 0.16-0.30). Mean pulse rate was 41.39/s (40.7, 34.0-47.8) and the mean dominant frequency was 2357 Hz (2177, 1733-2659). The second call type was emitted infrequently, and was possibly produced during

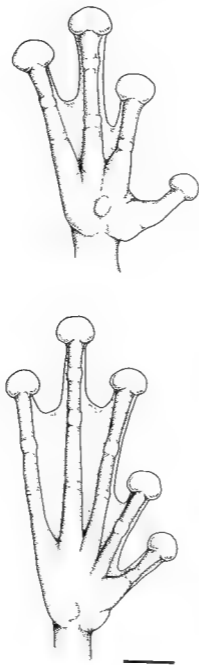


Fig 2 Palmar and plantar views of the hand and foot of *Litoria wapogaensis*, paratype (SAMA R54595) Scale bar: 2 mm



Fig. 3. – *Litoria wapogaensis* male in calling position, Wapoga, Irian Jaya

inter-male interactions, although further observations are required to confirm this. These calls were shorter (mean length 0.15 s), and had a much higher pulse rate (mean 235.97/s, fig. 5). Detailed analyses are presented in tab. 1.

*Natural history* The collection locality is in closed-canopy lower-montane rainforest. One specimen was collected at night from a *Pandanus* leaf at a height of about 1.0 m in a small *Pandanus* swamp. The remaining specimens were calling at night from fern fronds and other low vegetation along a slow-flowing, shallow and swampy stream (fig. 4). These were the only lentic waterbodies in the area. Despite the abundance of swiftly flowing streams in the region, this species was never collected or observed in lotic habitats.

*Comparison with other species* In its general size, dorsal colouration and extent of finger webbing, *Litoria wapogaensis* shows some affinities with *L. iris* and its allies (as defined by MENZIES, 1993) within the *L. nigropunctata* species-group. A comparison of morphological characters among montane green *Litoria* is presented in tab. 2. Most species can be readily distinguished in life on the basis of thigh colouration. The concealed surfaces of the thighs are brightly coloured (purple, orange, red or blue) in *Litoria chloronota*, *L. iris*, *L. mapkthuse* and *L. ollauru* (versus dark brown in *L. wapogaensis*). The latter three species also differ in possessing a violet patch in the groin and axilla (versus dark brown). *Litoria havina* has bright red thighs, and males are further distinguished from *L. wapogaensis* by the presence of a rostral spike (absent in *L. wapogaensis*). *Litoria wapogaensis* can also be distinguished from all of these species by its advertisement call, which is a single distinctly pulsed note. MENZIES

Table 1. - Advertisement call characteristics of *Litoria wapogaensis* sp. nov. Measurements are given as mean (standard deviation) range. See text for description of call types.

Specimen Call Type	SAMA R54595		SAMA R54596		MZB Amp 3876	
	slow	fast	slow	fast	slow	Fast
Air temperature (°C)	22.6		22.6		20.4	
n	5	1	5	1	12	4
Length (s)	0.182 (0.019) 0.16-0.20	0.359	0.224 (0.047) 0.176-0.301	0.095	0.214 (0.027) 0.16-0.252	0.115 (0.071), 0.07-0.22
Pulses	8-10	50	8-12	32	7-12	21-36
Pulse rate (pulses/s)	41.71 (1.89) 38.46-43.06	136.5	35.59 (0.9) 34.09-36.54	326.3	43.67 (3.0) 37.5-47.82	238.26 (58.56) 157.6-285.7
Dominant frequency (Hz)	2400 (141.83) 2204-2573	2834	2354 (35.68) 2315-2404	2326	2341 (285) 1733-2659	2142.3 (445) 1707-2708

(1993) and JOHNSTON & RICHARDS (1994) provided detailed descriptions of the calls of *L. iris* and other members of this group.

*Litoria contrastens* (male SVL 25-30 mm) is smaller than *L. wapogaensis* (male SVL 30.5-33 mm), with an immaculate dorsum (versus yellow-spotted), relatively shorter legs, a relatively longer snout, and without vomerine teeth (tab. 2). The shape of the snout (distinctly projecting in profile) is also quite different from *L. wapogaensis* (bluntly rounded in profile). *Litoria bulmeri* is a torrent-dwelling species (S. J. Richards, unpublished) that is readily distinguished from *L. wapogaensis* by having fingers free of webbing and a broad black lateral band, and is not considered further here. *Litoria longicrus* is a small species (SVL < 30 mm) with a broad white bar beneath the eye and has much longer legs than *L. wapogaensis* (TL/SVL 0.62-0.63 versus 0.53-0.59).

Four lowland species that are partly or entirely green in life are compared with *L. wapogaensis*. *Litoria nystax* is a small species (29.5 mm SVL) known only from the holotype. It can be distinguished from *L. wapogaensis* by its prominent and strongly curved canthus rostralis (versus poorly defined, slightly curved or straight), a broad white bar beneath the eye (absent in *L. wapogaensis*) and yellowish brown (versus white) venter (GYLER, 1968). *Litoria gracilentia* was described from northeastern Australia and the status of New Guinea populations is unclear (GUNTHER & RICHARDS, 2000). New Guinea specimens currently referred to *L. gracilentia*, and the recently described *Litoria elkeae*, are small green frogs (male SVL approximately 30 mm) in which the dorsum is frequently spotted with white, and there is a pale cantho-rostral stripe. The concealed surfaces of the thighs are cream or pale yellow in *L. elkeae* (versus dark brown in *L. wapogaensis*) (GUNTHER & RICHARDS, 2000).

*Litoria nigropunctata* is a small lowland frog that is predominantly brown or green-brown in life, and frequently exhibits small black spots on the dorsum. It further differs from

Table 2. - Comparisons among *Litoria wapogaensis* sp. nov. and small green *Litoria* occurring in the mountains of New Guinea (excluding *L. bulmeri* see text)

Species	SVL (mm) (males only)	Thigh colour	Violet in groin and axilla	TL/SVL	EN/IN	Advertisement call	Rostral spike (males only)	Vomerine teeth	Reference
<i>Litoria wapogaensis</i> sp. nov.	30.5-33	Dark brown	-	0.53-0.59	0.71-0.88	Single pulsed note	-	+	This study
<i>Litoria chloranota</i> (Boulenger, 1911)	27-32	Orange	-	0.52-0.58	0.63-0.71	Series of short and long notes	-	-	MENZIES, 1993
<i>Litoria contrastans</i> (Tyler, 1968)	25-30	Orange-red	-	0.45-0.54	0.89-1.17	Chicks followed by two-part buzz	-	-	TYLER, 1968, MENZIES, 1976
<i>Litoria havina</i> Menzies, 1993	30-36.5	Cherry red	-	0.54-0.6.	0.63-0.79	Series of whistles	+	-	MENZIES, 1993
<i>Litoria iris</i> (Tyler, 1962)	24-36	Purple, red or blue	+	0.46-0.63	0.77-0.97	Series of chicks and buzzes	-	+/-	MENZIES, 1993
<i>Litoria leucova</i> (Tyler, 1968)	30.5-35.4	Translucent pink with yellow spots	-	0.53-0.55	0.78-0.96	Short and long calls in long series	-	-	JOHNSTON & RICHARDS, 1994
<i>Litoria longicrus</i> (Boulenger, 1911)	27.4	Unpigmented	-	0.623-0.628	0.58-0.61	?	-	+	TYLER, 1968
<i>Litoria majikahse</i> Johnston & Richards, 1994	30.5-34.4	Crimson	+	0.43-0.60	0.72-1.03	Short chirp or harsh "raugh"	-	+	JOHNSTON & RICHARDS, 1994
<i>Litoria macro</i> Menzies, 1993	< 31 mm	Golden-yellow peppered black	-	0.51-0.56	0.8-1.1	?	+	-	MENZIES, 1993
<i>Litoria olivacea</i> Menzies, 1993	< 34 mm	Blue	+	0.54-0.59	0.75-0.95	Quiet creaking noise	-	+	MENZIES, 1993



Fig 4 Habitat of *Litoria wapogaensis* in lower montane rainforest Wapoga River headwaters, Irian Jaya.

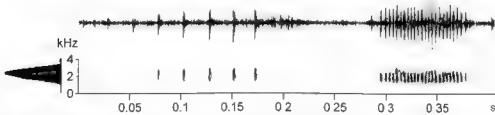


Fig 5 Wave form (top) and spectrogram and frequency spectrum (bottom) of two types of vocalisations of *Litoria wapogaensis*. Left, slow call; right, fast call.  $T_a = 22.6^\circ\text{C}$ .

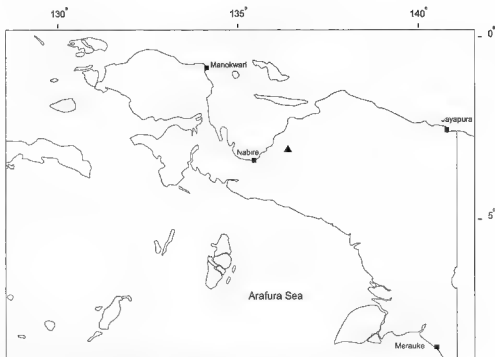


Fig. 6 Type (and only known) locality of *Litoria wapogaensis*, Irian Jaya, Indonesia

*L. wapogaensis* in having yellow (erroneously reported as black by JOHNSTON & RICHARDS, 1994) in the concealed parts of the thighs, in having a truncate (versus rounded) snout, and in its different advertisement call, which is an "irregular succession of clicks and buzzes" (MENZIES, 1972). Through the courtesy of Mr. David Price, we have examined several specimens and advertisement calls of *Litoria nigropunctata* from the vicinity of the type locality (Yapen Island, Irian Jaya). Morphologically and acoustically these animals agree closely with populations from mainland New Guinea (MENZIES, 1972; S. J. Richards, unpublished) and differ consistently from *L. wapogaensis* in the characters described above.

**Etymology** – Named for the headwaters of the Wapoga River, the major drainage system for the spectacular rainforest-clad mountains where the new species was collected

#### APPENDIX I ADDITIONAL SPECIMENS EXAMINED

*Litoria ilkeae* Gunther & Richards, 2000 INDONESIA Irian Jaya Province, Siewa paratypes MZB Amp.3866-9

*Litoria husina* Menzies, 1993 PAPUA NEW GUINEA Western Province, Ok Ma paratypes UP 8406-7.



- Litoria iris* (Tyler, 1962) PAPUA NEW GUINEA Southern Highlands Province, Tari, UP3115-35, Eastern Highlands Province, Ubagubi, UP8289-90; Enga Province, Porgera, UP7148-67, Sandaun Province, Teleformin, SAMA R5423, 5874
- Litoria leucova* (Tyler, 1968) PAPUA NEW GUINEA Sandaun Province, Mount Stolle: SAMA R44091-44092, UP 8604-6.
- Litoria longicrus* (Boulenger, 1911) - INDONESIA Irian Jaya Province, Wondessi syntype BM 1947 2.22.61
- Litoria mapkithse* Johnston & Richards, 1994 PAPUA NEW GUINEA Western Province, all in general vicinity of Tabubil: holotype SAMA R44093, paratypes UP 6734, UP 7305-9, UP 8501-8, UP 8602-3, SAMA R44094-44101.
- Litoria nuro* Menzies, 1993 PAPUA NEW GUINEA East Sepik Province, near Raut Village paratypes UP 2741-2743, UP 2745-2756.
- Litoria nigropunctata* (Meyer, 1875) PAPUA NEW GUINEA Morobe Province, Lae, SAMA R09296, Madang Province, Binek near Madang, SAMA R11794.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are extremely grateful to Dr Arie Budiman of Puslitbang Zoology, and the head of Museum Zoologicum Bogoriense LIPI, Iba Liliok Pr.jono, for their assistance in Jakarta and Bogor. This research was part of Conservation International's Rapid Assessment Program, and we greatly appreciate their assistance. Funding support was provided by the CI USAID Cooperative Agreement N°PCL-5554-A-00-4028-00. We are especially grateful to Dr Andy Mack, Dr Jatna Supriatna, and Mr Burke Burnett of CI for their support and assistance during the survey. PT Freeport Indonesia provided invaluable logistical support for which we are most grateful. Mr David Price kindly allowed the senior author to examine his valuable collection of frog specimens from Yapen Island, and the Price family provided generous hospitality to the senior author in Jayapura. Bronwen Scott produced fig. 1-2 and Warwick Browne helped produce the map. Mike Tyler kindly provided useful comments on the manuscript.

## LITERATURE CITED

- ALLISON, A. & DWYAHIRINI, A. A. 1997 *The amphibians and reptiles of the Freeport Contract of Work Region Irian Jaya: results from the survey of 4-26 March 1997*. Unpublished Report, PT Freeport, Jakarta
- BARKER, J., GRIGG, G. C. & TYLER, M. J. 1995 *A field guide to Australian frogs*. NSW, Surrey Beatty & Sons: i-x + 1-407
- FROST, D. R., (ed.). 1985 - *Amphibian species of the world*. Lawrence, Allen Press & Assoc. Syst. Coll. [i-iv] + i-v + 1-732
- GUNTHER, R. & RICHARDS, S. J. 2000 A new species of the *Litoria gracilentia* group from Irian Jaya (Anura: Hylidae). *Herpetozoa*, **13**: 27-43
- JOHNSTON, G. R. & RICHARDS, S. J. 1994 A new species of *Litoria* (Anura: Hylidae) from New Guinea and a redefinition of *Litoria leucova* (Tyler 1968). *Mem. Qld. Mus.*, **37**: 273-279
- MACK, A. & ALONSO, L., (ed.). 2000 A biological assessment of the Wapoga River area of northwestern Irian Jaya, Indonesia. *RAP Bulletin of Biological Assessment*, Washington, Conservation International, **14**: 1-129
- MENZIES, J. I., 1972 - Papuan tree-frogs of the *Litoria nigropunctata* group. *Herpetologica*, **28**: 291-300
- 1976 - *Handbook of common New Guinea frogs*. Wau, Papua New Guinea, Wau Ecology Institute Handbook N°1: i-viii + 1-75
- 1993 Systematics of *Litoria iris* (Anura: Hylidae) and its allies in New Guinea and a note on sexual dimorphism in the group. *Aust. J. Zool.*, **41**: 225-255

- TYLER, M J , 1968 Papuan hylid frogs of the genus *Hyla* *Zool Verhandl* , **96**: 1-203
- TYLER, M J & DAVIES, M , 1978 Species-groups within the Australopapuan hylid frog genus *Litoria* Tschudi. *Aust. J. Zool.*, suppl. **63**. 1-47.

*Corresponding editor* Alain DUBOIS

## Frog morphometrics: a cautionary tale

Lee-Ann C. HAYEK\*, W. Ronald HEYER\*\*1 & Claude GASCON\*\*\*

\* Mathematics & Statistics, MRC 136, National Museum of Natural History,  
Smithsonian Institution, Washington, DC 20560-0136, USA  
[hayek lee-ann@nmnh si.edu]

\*\* Amphibians & Reptiles, MRC 162, National Museum of Natural History,  
Smithsonian Institution, Washington, DC 20560-0162, USA  
[heyer ron@nmnh si.edu]

\*\*\* Field Support Program, Conservation International,  
2501 M Street, NW, Suite 200, Washington, DC 20037, USA  
[c.gascon@conservation.org]

Scant attention has been paid to measurement error in frog morphometric studies. We study both interobserver effects of measurement on the same specimens of *Vanzolinius discodactylus* (Anura, Leptodactylidae) and intraobserver effect of repeated measurements on a single *V. discodactylus* specimen. Interobserver measurements differ statistically and result in different biological interpretations in some cases. Evidence is provided that log transformation of raw data is often unnecessary. Allometric transformation of measurement variables to remove size effect requires parallel regression slopes of variable against size. This requirement is not met with the *V. discodactylus* data, nor is it likely to be met when several variables are used in a morphometric study. We recommend: assume measurement differences between sexes in frogs and analyze data separately by sex; consider and select the most appropriate statistical model options for data analyses; avoid pseudoprecise measurements; do not rush to logarithmic transformation; remeasure at least one individual frog 20 times to provide an assessment of measurement error in data interpretation; be conservative in drawing biological inferences from morphometric analyses, basing interpretations and conclusions only on very robust effect size estimates and differences.

### INTRODUCTION

Frogs are relatively soft-bodied organisms and their preservation requires considerable care. Limbs and body must be correctly positioned to achieve standardized preparation. Unfortunately, different preservatives and different individual techniques result in very different museum preparations for the same species (fig. 1). Therefore, precise, comparable measurements of preserved frogs are difficult. For example, one of the standard measurements taken on frogs, snout-vent length (SVL), is somewhat problematic in larger preserved frogs, because the sacral-urostyle portion of the body usually is fixed at an obtuse angle to the vertebral column. How much one "straightens out" the preserved animal has an effect on the

1 Corresponding author



Fig. 1 *Thoropa miliaris* (USNM 38936 on left, USNM 229848 on right) showing preservation/positioning differences that make accurate, comparable measurements difficult

resultant measurement. In spite of (or, perhaps oblivious to) these difficulties, researchers have used frog measurement data to address a variety of scientific questions. There has been little attention paid to precision and repeatability of frog measurement data and how this variation might affect the scientific questions being addressed

We know of only one study (LEE, 1982) that demonstrated important measurement differences between fresh and preserved frogs and differences in measurements taken on the same individuals at the same state of preservation. In that study, Lee took all the measurements himself using the same measuring equipment and methodology throughout. Although LEE (1982) presented extensive literature on the effects of preservation technique on fish morphology and discussed its relevance to frog morphometrics, herpetologists have generally ignored his warnings.

We are not aware of any published studies of the effect of different individual researchers taking the same set of measurements on the same frogs to measure inter-observer variability (although A. Dubois and A. Ohler have unpublished data on this topic, personal communication). Studies on other groups of organisms demonstrate that such differences are not trivial. LEE (1990) found differences in precision between two observers on scale count data taken from the same lizards. YEZERINAC et al. (1992) found that measurement error varied considerably, depending on the variable, for bird skeleton measurement data. In these studies, a constant value was being measured. That is, the number of scales did not change on any individual lizard, nor did the individual bird bones change size or shape. As indicated above, this is not true for whole frog specimens: how the specimen is positioned will determine what the value of the measurement will be for several of the measurements (variables) commonly taken for frog morphometric studies.

PAGANO & JOLY (1999) compared a select group of morphological measures on water frogs with an analysis of allozymic markers. These authors concluded that frog morphology was of limited use for their identification purposes. They determined frog body landmarks for measurement points from digitized photographs of specimens. Data were input and analyzed on a computer. Similar methodology has proved acceptable for characterization of stratigraphic sections (see e.g., BRNSON et al., 1995), in which the surfaces are approximately linear and two-dimensional. However, for examination of three-dimensional, soft-bodied organisms, the use of such methods further complicates the measurement process. Despite the stated advantage of magnification of digitized figures for measurement purposes, statistical error minimization has not been proved to be achievable for measurements taken from frog photographs. Based on our experience, we do not recommend using photographs of frogs from which to take morphometric data.

One of us (CG) took a series of measurements on specimens of the frog species *Vanzolinius discodactylus* (Anura, Leptodactylidae) from the Rio Juruá in Brazil to test the riverine hypothesis of speciation (GASCON et al., 1996). Another of us (WRH) used the same specimens in a study examining differentiation throughout the entire species range of *V. discodactylus* (HEYER, 1997). WRH took the same set of measurements on the same frogs that CG measured. The two data sets were given to LCH to analyze and evaluate. During the course of this study, LCH reevaluated the statistical procedures and assumptions used in the GASCON et al. (1996) study.

The objectives of this study are: (1) to evaluate inter- and intra-observer statistical differences of measurement sets, (2) to understand the kinds of differences investigators create when measuring frogs, (3) to evaluate the effect of measurement differences on certain statistical procedures that are generally applied in frog morphometric studies, and (4) to judge whether measurement differences yield different biological interpretations.

## METHODS AND MATERIALS

Fourteen measurements were made on each frog, following the methodology in GASCON et al. (1996). The fourteen variables are: snout-vent length (SVL), nostril separation, eye

width anterior, eye width posterior, head width, head length, eye to nostril distance, tympanum diameter (tympanum height of GASCÓN et al., 1996), eye length, thigh length (femur length of GASCÓN et al., 1996), shank length (tibia length of GASCÓN et al., 1996), foot length, maximum width of disk on third finger, and maximum width of disk on fourth toe.

Prior to WRH's taking of these data, he confirmed landmarks with CG for a subset of the variables in an attempt to make certain that the measurements would be comparable.

CG and WRH measured each individual one time.

CG used digital calipers linked to an IBM-PC, measurements were made to the closest 0.01 mm and the data were recorded with three decimal places. WRH used Helios dial calipers, measurements were made to the closest 0.1 mm and the data were recorded with one decimal place.

To assess individual measurement error, WRH measured one male, USNM 348976, 20 times over a 12 day period. The eye region on one side of the head is slightly squashed, otherwise this specimen is in reasonable shape. The specimen is about average in overall state of preservation and positioning in terms of ease of measurements. Measurements were taken at various times of the day and measurements were never taken one immediately after the other to eliminate or minimize carry-over effects of learning or memory. For SVL, efforts were made to focus visually on the caliper jaws when measuring the specimen and not to look at the readout dial until after the jaws had been set. All other measurements were taken under a dissecting microscope with the calipers while the measurement readout dial was not visible in the field of observation. Measurements were recorded on dated and timed separate, individual data sheets.

CG and WRH used different criteria to categorize sex of the individuals. CG used three categories: F, M and 0. In cases where CG opened the frog to take tissues, sex and whether the individual was adult or not were determined by the state of its gonads. Individuals recorded as 0 were not opened. These data were recorded under field conditions. For the morphological analyses reported by GASCÓN et al. (1996), data for adult and non-adult males were combined as were the data for adult and non-adult females. WRH used five categories: M, F, B, G and J. The M (adult male) category was determined by presence of vocal slits in males. The F (adult female) category was determined by presence of developed ova or some curliness of the oviduct in females. The B (juvenile male) category was determined by presence of testes. The G (juvenile female) category was determined by presence of ovaries. The J (juvenile) category was used when sex could not be determined, either because the gonads were indeterminate in very small specimens or the gonads had been removed from the specimens when tissues had been taken. These data were taken in the laboratory with the aid of a Wild stereoscopic dissecting microscope.

Male and female immature gonads of *Xenohyla discodactylus* are quite similar in appearance and difficult to differentiate without detailed examination under magnification. Both ovaries and testes have a mosaic like pattern externally. The only consistent difference between immature gonads is that the testes have a smooth external surface, whereas ovaries have an irregular external surface. Not surprisingly, the difficulty of differentiating gonads using the unaided eye resulted in several different interpretations of sex by CG and WRH. The differences are (CG determination, followed by WRH determination) INPA 2410 (F, B), INPA 2371, 2433, 3397, 5605, 5671, 5728, 5735, 5736, 5799, 5801 (M, G), INPA 3572, 5571 (F,

J, gonads now removed in both), INPA 3177, 3573, 5524, 5592, 5670, 5697, 5730 (M, J, gonads now removed in all).

WRH's categories of adult male (M) and adult female (F) are used in the analysis section for both the CG and WRH measurement data sets unless otherwise noted. Using this categorization, 88 adult individuals are available for analysis. Each variable was examined and summarized separately for male and female adults. Graphs and descriptive statistics were calculated and assumptions tested prior to means tests or predictive analyses. Logarithmic transformations were performed and descriptive statistics calculated on the transformed values as well. Tests of normality were performed and discussed below.

In this study, we cannot calculate residual measurement error because we do not have the "true" value of the variable for any individual specimen. Similarly, we are unable to assess a statistical variability estimate for the factors involved in the overall measuring error. That is, we cannot remove intra-observer variability from inter-observer measurement error. We therefore evaluate the two factors separately.

We distinguish "precision" from "accuracy". Accuracy is the closeness of an observer's measurement to the quantity intended to be measured. In our case, this is unknown for the true value of the frog's morphological measurement but can be evaluated by considering the closeness of the results of the two observer's values. Precision refers to the entire class of measurements and how well repeated measurements self-conform. In this case, the mean value does not have to be the "true" value of the variable. To examine these characteristics we calculated both inter- and intra-observer variability estimates and also descriptive measures for qualitative evaluation of the frog data.

Data were analysed either using direct mathematical formulae or using the software package SPSS 8.0 (ANONYMOUS, 1998). Although the discriminant function analyses were done using SPSS 8.0 (ANONYMOUS, 1998), the figures were produced using either SYSTAT versions 7 (ANONYMOUS, 1997, for fig. 7) or 9 (ANONYMOUS, 1999, for fig. 5-6).

#### THE APPROPRIATENESS OF RAW DATA TRANSFORMATION PROCEDURES IN FROG MORPHOMETRIC STUDIES

GASCON et al. (1996) used an allometric transformation procedure described by THORPE (1976) in an effort to remove size effects from the data. The Thorpe procedure (presented in detail in THORPE, 1975) involves two steps: (1) log-transforming the original measurement data; and (2) transforming the log values using a common slope based on the entire data set. The topic of transforming raw data is discussed first, followed by demonstration that the statistical assumptions of the Thorpe procedure are not met by the *Vanzolinius* data as used by GASCON et al. (1996).

Although not specifically mentioned by GASCON et al. (1996), the raw measurement data were log-transformed as part of THORPE's (1976) transformation procedure. Raw data are transformed as a matter of course in many multivariate analyses of frog morphometric data (for a recent example see GREIN et al., 1997). SOKAL & ROHLF (1969) state that log transformation is the most common transformation for biological data and they provide a cogent

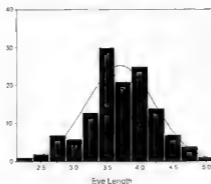


Fig 2 Histogram of eye length values measured by CG on total sample of 131 frogs with normal distribution best fit

discussion on the topic of log-transforming variables as a way to meet some statistical test assumptions that are not met by raw variable data. However, this transformation is often applied routinely, when, in fact, it may be either unnecessary or incorrect to do so.

Replacing each measurement by its logarithm may result in more approximate variance equality. Also, for many biological applications the data can be normalized by this change. The assumption of concern for our purposes is whether the variables are normally distributed. Using BESTFIT (ANONYMOUS, 1995) on the data as analyzed by GASCÓN et al (1996), untransformed variables for the entire sample size of 131 individuals were fit with a normal distribution (see fig. 2 for an example). We used the Anderson-Darling test criterion as well as a chi-square test of fit. The Anderson-Darling criterion is more tail-sensitive than the ordinary chi-square goodness-of-fit test.

SOKAL & ROHLF (1969) state that the log transformation may be appropriate and useful when the means of the samples are proportional to the range or standard deviation of the respective samples. The biological questions we are asking of the *Vanzolinius* data require grouping of the data by locality. None of the variables, for the total sample or when organized by locality, show a relationship of mean with either standard deviation ( $r = 0.06$  ns) or range ( $r = 0.19$  ns). In addition, each raw variable plot shows approximate symmetry, lack of prominent skewness and unimodality (for example, snout-vent length as shown in fig. 3).

Thus, the data as analyzed by GASCÓN et al (1996) can be appropriately analyzed as raw variable measurements, rather than log transformed variables. It is not incorrect statistically to apply and use the logarithmic sample data for this problem. It is, however, unnecessary for the morphological variables being measured here.

The reason GASCÓN et al (1996) used logarithmic transformation was to attack the problem of allometry effects in their data, which included both adults and juveniles. THORPE (1976) presented a procedure that uses a log transformation as an initial step toward eliminating the influence of allometry. We examined the application of this approach and found it inappropriate for the *Vanzolinius* data for the following reason:



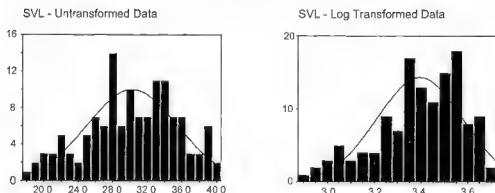


Fig. 3 – Histogram of SVL values measured by WRH with a normal distribution curve superimposed on both raw and log transformed data for 131 specimens.

Following THORPE (1975), GASCON et al. (1996) used the allometric transformation for all variables to “remove size effects for the data”. Raw measurements were adjusted using a common slope for all locality data sets and sexes combined. This procedure adjusts the allometric character or variable by using the slope of its regression against size. When there are multiple localities, as in the case of the present work, the pooled within-locality slope is used to make the adjustment.

This procedure can be applied appropriately only when the locality slopes are approximately parallel. That is, when a test of slope homogeneity (the first step in most packaged ANCOVA programs) shows no significance, the slopes from the separate localities can be pooled. For the 11 localities of this study, that is not the case. When there is heterogeneity, one can do the calculations to obtain a common within-locality slope, but the resultant number is meaningless. When the slope test indicates heterogeneity, as is the case for this data set ( $P = 0.001$ ), there can be no one slope to describe the data (fig. 4). Therefore, the problem of size effects in the GASCON et al. (1996) data would remain.

We can eliminate the need to consider allometry by using only adults but we still need to consider sexual size effects. If size effects are not present or if they can be removed statistically, then male and female specimens can be pooled for analyses that can be more statistically powerful. As stated by GASCON et al. (1996), the transformation manipulations they (inappropriately) applied did remove size effects between males and females (which included both immature and mature individuals) for all variables except head length. They deleted this variable from their analyses and combined male and female data in their analyses. In our analyses, we examine the sex differences on both raw and transformed variables using adults only.

When the raw variables are examined using CG's classification of males and females (124 total) and his measurements: (1) all fourteen variables have non significant univariate homogeneity of variance tests (an assumption for means tests), (2) all univariate  $F$  tests ( $F_{1, 122}$ ) on means are significant ( $P = 0.000$ ), (3) the multivariate  $F_{14, 122}$  is significant ( $P = 0.000$ ,

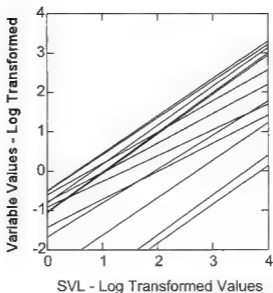


Fig 4 Fourteen regression slopes for morphometric variables, log transformed, CG measurements, for 131 specimens per variable.

Hotellings  $T^2 = 1.075$ ); and, (4) homogeneity of slope is rejected ( $P = 0.000$ ). No regression effect could be determined and removed. Similar results hold for the logarithmic-transformed data. Thus, it is inappropriate to assume that we can combine Gascon's raw male and female data in univariate or multivariate analyses. We know of no valid procedure to remove the sexual size differences under the conditions involved with this data set.

When WRH's raw data of 88 (57 female; 31 male) known adults are used: (1) all 14 variables have non-significant univariate homogeneity of variance test results; (2) all univariate  $F_{1, 86}$ -tests ( $t$ -tests,  $df 86$ ) are significant ( $P = 0.000$ ); and, (3) multivariate  $F_{14, 84}$  is significant ( $P = 0.000$ ). Similar results held for the log-transformed variables. In practice then, because of equivalent results with this sample data, either the log-transformed or the raw data could be used for further testing. However, it is an unnecessary complication for both application and interpretation to transform a variable when the raw data can be used. We continue with the raw data results for the 88 adult specimens, for which males and females test significantly different on each of the measurements considered.

## ANALYSIS OF MEASUREMENT DATA

## EFFECT OF ROUNDING

There are two components to consider when rounding a raw measurement value that could impact amphibian data sets: (1) pseudo-precision, and (2) the number of decimal places used by computers in calculating statistical algorithms.

Pseudo-precision is using greater precision in calculations for measurements than can be justified in terms of the originally recorded accuracy of those measurements. For example, if multiple measures of the tympanum diameter of the same individual frog specimen are 2.165, 2.224, 2.187, 2.240, 2.193, the tympanum cannot be measured accurately beyond one decimal place. Using values with two or three decimal places for these values is pseudo-precision. Statisticians advise using precise measurements only (e.g., SOKAL & ROHLF, 1969, 13-16). Biological practitioners routinely ignore this advice. For example, although WRH uses mechanical dial calipers that record measurements to the nearest tenth of a millimeter, in the size range of *Vanzolimus discodactylus*, snout-vent length can be measured only to a precision of 0.6 (see tab. 4). Thus, this variable should be recorded to the whole number, not with one decimal place.

A second potential biological consequence results from the number of decimal places computers use in calculations. This is less of a problem now with recent computer advances in calculation. However, using pseudo-precise measurement data certainly can result in different numerical values for test statistics, which are summarizations. To test whether any biologically meaningful interpretations would be drawn from our data due solely to rounding errors, paired *t*-tests were computed on two sets of the data. We compared the CG and WRH measurements as recorded (WRH with one decimal place, CG with three) with both data sets recorded to one decimal place. The CG data set was rounded by the usual method of rounding up the  $i^{\text{th}}$  place when the  $(i+1)^{\text{th}}$  place is 5 or more.

As expected, when different numbers of decimal places are used (rounded vs. not) for the data set, several of the resultant test values vary slightly. However, in no case are the decisions different for the selected test level (0.05, 0.01, 0.001), nor would any different biological inferences likely be drawn from the observed probability levels (tab. 1) from corresponding tests.

While pseudo-precision, as a consequence of computer generated or digital caliper induced values, is biologically and statistically offensive, it does not impact seriously the univariate descriptive or inferential results of real data sets such as ours for *Vanzolimus discodactylus*.

## INTER-OBSERVER DIFFERENCES

A battery of descriptive statistics was run on the raw measures of WRH-defined adults to evaluate the nature of differences between the CG and WRH measurements (tab. 2). The mean for each observer was calculated for each measurement. The usual assumption for a

Table 1 Comparison using CG measurements at three decimal places and rounded off to one decimal place to WRH measurements at one decimal place. Mean values reported at statistically inappropriate 4 decimal place level, to demonstrate effect of computation results

Variable	Data set	Means		Coefficient of variation		T - statistic		T - significance	
		0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0
Snout-vent length	CG	30.1270	30.1282	5.85	5.85	-2.85	-2.82	0.005	0.005
	WRH		30.2260		5.77				
Nostril separation	CG	2.7058	2.7053	6.87	6.78	5.98	5.92	0.000	0.000
	WRH		2.5908		6.76				
Eye width anterior	CG	5.8029	5.8000	7.06	7.12	-7.67	-7.52	0.000	0.000
	WRH		6.0130		7.02				
Eye width posterior	CG	8.1690	8.1710	6.82	6.84	-9.79	9.79	0.000	0.000
	WRH		8.4771		7.14				
Head width	CG	10.5286	10.5321	5.76	5.76	-0.57	0.48	ns	ns
	WRH		10.5496		6.17				
Head length	CG	11.0501	11.0430	5.58	5.59	14.57	-14.66	0.000	0.000
	WRH		11.9618		6.80				
Eye-nostril distance	CG	3.5326	3.5290	6.30	6.29	-3.21	-3.36	0.002	0.001
	WRH		3.5901		6.34				
Eye length	CG	3.7019	3.7046	7.11	7.15	8.70	8.80	0.000	0.000
	WRH		3.4917		8.02				
Tympanum diameter	CG	1.9437	1.9450	5.40	5.39	16.67	-16.09	0.000	0.000
	WRH		2.1962		5.53				
Thigh length	CG	12.8507	12.8489	5.50	5.50	-3.99	-4.02	0.000	0.000
	WRH		13.0870		5.60				
Shank length	CG	14.3533	14.3542	6.6	6.16	10.94	10.81	0.000	0.000
	WRH		14.1160		6.00				
Foot length	CG	15.4560	15.4550	5.97	5.98	-12.87	-12.86	0.000	0.000
	WRH		16.0511		5.86				
Third finger disk width	CG	0.6413	0.6427	5.13	5.06	-4.83	-4.39	0.000	0.000
	WRH		0.6710		6.10				
Fourth toe disk width	CG	0.8215	0.8260	5.8	5.04	-10.44	-9.48	0.000	0.000
	WRH		0.8962		5.46				

Table 2 - Descriptive statistical differences between CG and WRH measurement data on the same specimens of adult *Vanzolinius discodaetylus* (n = 88).

Variable	Data set	Mean	Standard deviation	Variance	Standard error	Coeff variation	Hartley test	t	Observed P (2 tail)	r	P (2 tail)	Coeff determin
Snout-vent length	CG	32.54	3.90	15.19	0.42	8.35	1.03	-3.15	0.002	1.00	0.000	0.99
	WRH	32.67	3.95	15.63	0.42	8.26						
Nostril separation	CG	2.87	0.32	0.10	0.03	8.88	0.81	5.24	0.000	0.75	0.000	0.57
	WRH	2.75	0.29	0.08	0.03	9.47						
Eye width anterior	CG	6.16	0.64	0.41	0.07	9.60	0.99	-6.47	0.000	0.87	0.000	0.76
	WRH	6.38	0.63	0.40	0.07	10.12						
Eye width posterior	CG	8.71	0.92	0.85	0.10	9.45	0.97	-7.30	0.000	0.92	0.000	0.84
	WRH	9.01	0.9	0.83	0.10	9.91						
Head width	CG	11.38	1.36	1.85	0.14	8.36	0.88	0.66	0.508	0.95	0.000	0.90
	WRH	11.35	1.28	1.64	0.14	8.88						
Head length	CG	11.98	1.33	1.77	0.14	9.01	0.94	-12.42	0.000	0.89	0.000	0.80
	WRH	12.79	1.29	1.66	0.14	9.91						
Eye - nostril distance	CG	3.76	0.42	0.18	0.04	8.87	1.02	-3.66	0.000	0.88	0.000	0.77
	WRH	3.84	0.43	0.18	0.05	8.98						
Eye length	CG	3.91	0.43	0.18	0.05	9.03	0.50	7.120	0.000	0.73	0.000	0.54
	WRH	3.69	0.31	0.09	0.03	12.01						
Tympanum diameter	CG	2.08	0.30	0.09	0.03	6.96	1.20	-14.12	0.000	0.89	0.000	0.79
	WRH	2.35	0.33	0.11	0.04	7.18						
Thigh length	CG	13.87	1.87	3.51	0.20	7.40	1.01	3.14	0.002	0.94	0.000	0.89
	WRH	14.08	1.88	3.54	0.20	7.49						
Shank length	CG	15.38	1.75	3.07	0.19	8.77	1.05	8.74	0.000	0.99	0.000	0.98
	WRH	15.14	1.80	3.23	0.19	8.43						
Foot length	CG	16.61	1.96	3.82	0.21	8.49	1.05	-11.86	0.000	0.96	0.000	0.93
	WRH	17.28	2.01	4.03	0.21	8.61						
Third finger disk width	CG	0.70	0.10	0.01	0.01	6.96	0.79	-2.83	0.006	0.73	0.000	0.53
	WRH	0.72	0.09	0.01	0.01	8.06						
Fourth toe disk width	CG	0.89	0.12	0.02	0.01	7.15	1.08	-8.11	0.000	0.77	0.000	0.59
	WRH	0.97	0.13	0.02	0.01	7.51						

Table 3 – Performance rankings of measurement variables

Variable	Mean difference-mean	Coefficients of variation	Differences in coefficients of variation	Hartley test
Snout-vent length	Good	Best	Good	Good
Nostril separation	Moderate	Moderate	Good	Moderate
Eye width anterior	Moderate	Worst	Good	Good
Eye width posterior	Moderate	Moderate	Moderate	Good
Head width	Good	Best	Moderate	Moderate
Head length	Poor	Moderate	Poor	Moderate
Eye-nostril distance	Moderate	Moderate	Good	Good
Eye length	Poor	Worst	Poor	Poor
Tympanum diameter	Poor	Best	Good	Moderate
Thigh length	Moderate	Best	Good	Good
Shank length	Moderate	Moderate	Good	Good
Foot length	Moderate	Best	Good	Good
Third finger disk width	Moderate	Best	Poor	Moderate
Fourth toe disk width	Poor	Best	Moderate	Good

Student's *t*-test are not met because the observers measured the same sample and not samples independently chosen at random. Because these are repeated measurements, the test statistic denominator we use to test for a difference between each observer pair of measures is the formula for the standard error of a difference when samples are not independent. That formula is  $s_{m(1), m(2)} - s_d = \sqrt{(s_{m(1)}^2 + s_{m(2)}^2 - 2s_{m(1), m(2)}r_{1,2})}$ , where  $m(1), 1 = 1, 2$ , are the two observers means for the particular measurement,  $s$  is the standard deviation for each, and  $r$  is the correlation between the two sets of paired measures. Alternatively, for  $n$  pairs, the standard deviation of the  $d$  differences can be written,  $s_d = \sqrt{((n \sum d^2) - (\sum d)^2 / (n-1))}$ , and the test statistic is  $t = \sum d / s_d$ .

The paired *t*-test results indicate that all variables differ significantly except for one (head width). The correlation coefficients are all statistically significant and most coefficients of determination are high. The correlation statistics, considered with corresponding coefficient of variation values, indicate that the two sets of observer measurements are consistent and generally comparable. The *t* test results leave no doubt, however, that overall, our two sets of measurements differ statistically.

Given that our measurements are statistically different, we wish to explore our measurement performance on a variable by variable basis. To do this, various ways of describing performance are ranked and compared.

(1) Mean inter-observer difference of measures adjusted by magnitude of variable. The intent of this comparison is to evaluate how well the two sets of measurements agree with each other, specifically to see if the observers performed better on larger measurements than smaller (e.g., snout-vent length (SVL) vs. width of third finger disk). The smaller mean value

for the same individuals and for each variable was subtracted from the larger. That number was divided by the average value of the two means. The resultant values range from 0.002 to 0.126. For comparative ranking purposes, good is considered to be 0.000-0.005, moderate 0.005-0.050, and poor 0.050-0.150 (tab. 3).

(2) Coefficients of variation. Values of the coefficient of variation (CV) for each measure are often used to compare the variability of the variables. Adjustments for sample size and other factors have been suggested (e.g. DELAUGERRE & DUBOIS, 1985). We chose to use the original formula and to categorize the CV values because, regardless of adjustment, the CV remains extremely sensitive to errors in sample means. For evaluation and ranking purposes, the best category, 5.0-6.0, has the lowest variability in the attribute measured; moderate is 6.0-7.0, and the worst category is 7.0-8.0 (tab. 3). Most of the coefficient of variation values for each observer pair fall into the same categories (see tab. 2); in the few cases where our values fell in different categories, the average of our values was used for category placement.

(3) Difference in coefficients of variation. The intent of this comparison is to evaluate repeatability of our measurements. If each of us has the same degree of measurement repeatability, our coefficient of variation values should be identical. Therefore, how different these values are indicates degree of deviation from consistency of measurement for the variable involved. For ranking purposes, good is a difference of 0.0-0.2, moderate is 0.3-0.5; and poor is 0.6-1.5 (tab. 3).

(4) Hartley F-max test. The Hartley test statistic, which is the quotient of the larger and the smaller variance, provides another way to evaluate repeatability of measurements. A Hartley test value of 1 is not significant, values both larger and smaller indicate differences. For ranking purposes, good is 0.9-1.1, moderate 0.8-0.9 or 1.1-1.2, and poor < 0.8 (tab. 3).

From the above (tab. 3), it is apparent that CG and WRH measured one variable consistently and with the greatest precision: snout-vent length. There are five variables that we measured with reasonable consistency and precision: head width, eye-nostril distance, thigh length, shank length, and foot length. There are four variables that we apparently measured differently, but each of us with reasonable to good precision: head length, tympanum diameter, foot length, and width of fourth toe disk. Apparently we are using slightly different landmarks for these measurements. For the tympanum, it would seem that CG's description of tympanum height (GASCON et al., 1996) does in fact describe something different from WRH's definition of tympanum diameter. Once these results became known, CG confirmed that he always measured the vertical distance of the tympanum relative to head position and WRH took the measurement at the point of greatest tympanum diameter, irrespective of position of the tympanum relative to the head. For the width of the fourth toe, we obviously used different criteria of how much contact of the disk with the calipers was used. The most inconsistent measurement is eye length. That is, we measure the variable differently as well as imprecisely. This suggests that this variable should not be used for morphometric analyses in *Xenohyla discodactylus*. We further suggest that because this variable is affected by preservation artifact to a great degree, it should probably not be included in any frog morphometric study.

There is one result we find surprising. Overall, we measured larger variables (such as snout-vent length) equally as well (or poorly, depending on perspective) as smaller variables (such as third finger disk width).

Table 4 Descriptive statistics for 20 repeated measurements of a single specimen of *Vanzolinius discodactylus*

Variable	Minimum	Maximum	Mean	Standard deviation	Coefficient of variation
Snout-vent length	26.1	26.7	26.4	0.16	0.01
Nostril separation	2.0	2.4	2.2	0.09	0.04
Eye width anterior	5.1	5.6	5.4	0.12	0.02
Eye width posterior	7.4	8.0	7.7	0.17	0.02
Head width	9.0	9.3	9.2	0.10	0.01
Head length	10.0	10.6	10.3	0.16	0.02
Eye-nostril distance	2.9	3.2	3.0	0.09	0.03
Eye length	3.0	3.8	3.4	0.19	0.06
Tympanum diameter	1.6	1.8	1.7	0.06	0.03
Thigh length	11.0	11.8	11.4	0.24	0.02
Shank length	11.8	12.1	12.0	0.07	0.00
Foot length	12.8	13.7	13.2	0.24	0.02
Third finger disk width	0.5	0.6	0.6	0.02	0.04
Fourth toe disk width	0.7	0.8	0.8	0.04	0.05

#### INTRA-OBSERVER DIFFERENCES

Standard descriptive statistics for the twenty repeated measurements on each morphological variable of the single specimen (tab. 4) generally mirror inter-observer variation. That is, SVL, which CG and WRH measured with greatest precision, has a low intra-observer coefficient of variation. Eye length, which was the most imprecise inter-observer variable, has the highest intra-observer coefficient of variation.

Given the thousands of frogs that WRH has measured, one would predict that there would not be a change (improvement) in measurement accuracy from the first re-measure to the twentieth. Two sample *t*-tests of measurements 1-10 against measurements 11-20 were not statistically significant, except for posterior eye width. Given that the eye that was measured was misshapen with preservation, it is likely that the landmarks used by WRH changed over the re-measurement process.

#### BIOLOGICAL INTERPRETATIONS OF MEASUREMENT DIFFERENCES

##### INTR-OBSERVER DIFFERENCES

Our inter-observer differences over sets of measurements are unarguably statistically different at highly significant levels, yet it does not necessarily follow that such inter-observer



measurement differences lead to different biological conclusions for the same set of specimens. For example, it seems likely that some of our measurement differences are due to consistent differences in the way we took the measurements. Given a large enough sample, such differences would be statistically significantly different. However, because the measurements would have been taken consistently by each observer, the variation described in the two sets of measurements would be equivalent, and, hence, lead to similar conclusions for any biological inferences drawn from the data. We test this idea using our measurement data in two analyses aimed at obtaining insight into biological processes through analyses of morphometric data.

### *Geographic variation*

Multivariate discriminant function analyses are often used to analyze patterns of geographic variation in study organisms. For our purposes, we grouped the specimens from GASCON et al.'s (1996: 377, fig. 1) eleven numbered localities into four major groups, separated linearly along the Rio Juruá. Our Area 1 is GASCON et al.'s (1996) locality 1 ( $n = 7$ ), Area 2 is localities 2+3+8+9 ( $n = 20$ ), Area 3 localities 4+5+10+11 ( $n = 50$ ) and Area 4 localities 6+7 ( $n = 11$ ). We use only WRH-defined adult specimen raw data ( $n = 88$ ) in the analyses.

As described previously, the data for males and females are significantly different ( $P < 0.001$ ). The values for each of the variables are assumed to have a multivariate normal distribution with equal variance-covariance matrices (VCV) within the 4 areas. To decide whether to combine the sexes, locality tests should be performed. However, all tests of VCV equality are highly sensitive to normality. In addition, there is no practical, effective test for multivariate normality for our smaller-sized samples. We can hypothesize that since the sexes are highly significantly different over the entire sample then they should be different in and over each area. Alternatively, we might not.

Let us use the untransformed measurements to examine the results of a discriminant analysis by sex. We use WRH's designations of adult males and females and compare final results when using each observer's measurements.

For the female data (Area 1:  $n = 5$ , Area 2:  $n = 12$ , Area 3:  $n = 34$ , Area 4:  $n = 6$ , total  $N = 57$ ), the discriminant analysis results for each of the observer's data sets are far from identical (tab. 5, fig. 5). Of particular interest is that, in the stepwise procedure, the variable entered in the first step (that which explains the greatest amount of unconditional univariate variance among area samples) differed, as did the variables used in the final model. Since the variable impact differed between the two data sets in the discriminant model, it is not surprising that there were differences in the values for the canonical functions, first axis variable loading, and posterior classifications (tab. 5).

Male data (Area 1:  $n = 2$ , Area 2:  $n = 8$ , Area 3:  $n = 16$ ; Area 4:  $n = 5$ , total  $N = 31$ ) results are similar (tab. 6, fig. 6) to the female results in the kinds of discrepancies that measurement differences caused in the discriminant function analyses for the two sets of measurement data.

Would the different results from these analyses result in different biological interpretations? One of the main methods for evaluating such geographic variation analyses is the plot of the first two canonical axes. The discriminant function program in SYSTAT 9 (ANOVA-

Table 5 Comparison of discriminant function analysis results for female data of *Vanzolimus discodactylus* by geographic regions, with two sets of measurements taken on the same individuals.

CG measurements	WRH measurements
Significant univariate F-test SVL Head length Head width Nostril separation Eye-nostril distance Eye width anterior Eye width posterior Tympanum diameter Thigh length Shank length Foot length	Significant univariate F-test SVL Head length Head width Nostril separation Eye-nostril distance Eye width anterior Eye width posterior Tympanum diameter Thigh length Shank length Foot length
Stepwise discriminant model First variable tried Thigh length Final model uses Posterior eye width Head width Thigh length Foot length Eye length Third finger disk width All groups separable at 0.001 level in final model	Stepwise discriminant model First variable tried Tympanum diameter Final model uses Posterior eye width Shank length Tympanum diameter Final model cannot separate Group 4 from Group 1
Canonical discriminant function F #    Eigenvalue    % variation $\sim \chi^2$ 1       1.2801        0.55    0.000 2       0.8429        0.36    0.000 3       0.2028        0.09    0.052 <i>ns</i>	Canonical discriminant function F. #    Eigenvalue    % variation $\sim \chi^2$ 1       1.1674        0.77    0.000 2       0.2750        0.18    0.002 3       0.0718        0.04    0.056 <i>ns</i>
First axis explanation Thigh length (0.94) Head width (-0.66) Foot length (0.63) Third finger disk width (-0.52)	First axis explanation Tympanum diameter (0.93) Posterior eye width (-.058) Shank length (0.51)
Overall classification Group        % 1            100 2            88 3            69 4            80 Overall      77.4	Overall classification Group        % 1            80 2            83 3            83 4            67 Overall      80.7

## Female Data

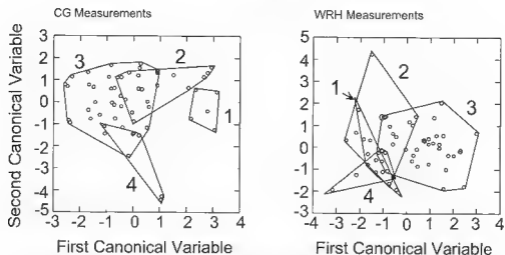


Fig. 5 - Discriminant function analysis results for female *Vanzohmus discodactylus* by geographic Areas 1-4 (see text for definition of areas)

## Male Data

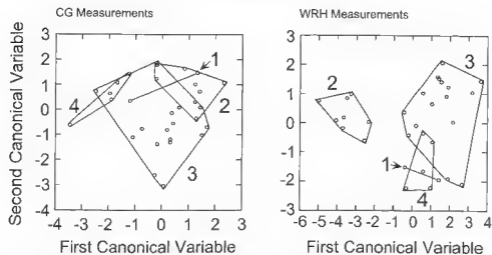


Fig. 6 - Discriminant function analysis results for male *Vanzohmus discodactylus*, by geographic Areas 1-4 (see text for definition of areas)

Table 6 - Comparison of discriminant function analysis results for male data of *Vanzolimus discodactylus* by geographic regions, with two sets of measurements taken on the same individuals.

CG measurements	WRH measurements
Significant univariate F-test SVL Head width Tympanum diameter Thigh Shank Foot	Significant univariate F-test SVL Nostril separation Eye-nostril distance Eye length Tympanum diameter Thigh Shank Foot Third finger disk width Fourth toe disk width
Stepwise discriminant model First variable tried Tympanum diameter Final model uses Head width Eye width posterior Tympanum diameter Shank Final model cannot separate Area 1 from Area 3 Area 1 from Area 4	Stepwise discriminant model First variable tried Tympanum diameter Final model uses Head length Eye length Eye width posterior Shank Final model cannot separate Area 2 from Area 3 Area 3 from Area 4
Canonical discriminant function F. #    Eigenvalue    % variation $\sim \chi^2$ 1        1.1000            0.49    0.000 2        0.8908            0.40    0.001 3        0.2416            0.11    0.0600 <i>ns</i>	Canonical discriminant function F #    Eigenvalue    % variation $\sim \chi^2$ 1        4.4500            0.89    0.000 2        0.5020            0.10    0.080 3        0.0272            0.01    0.708 <i>ns</i>
First axis explanation Head width (-1.97) Shank (1.23)	First axis explanation Head length (-2.99) Tympanum diameter (1.43) Third finger disk width (1.55) Eye length (0.91)
Overall classification Group    % 1            100 2            58 3            71 4            100 Overall    73.7	Overall classification Group    % 1            100 2            100 3            69 4            80 Overall    80.7

MOUS, 1999) was used to produce fig. 5 and 6. The forward step option was used. The female data differ in the distinctiveness of specimens from Area 1 (fig. 5) and might or might not be given different biological interpretations by different researchers. For example, the CG results (fig. 5, left) could be interpreted as supporting a model of more-or-less linear differentiation along the river, whereas the WRH results (fig. 5, right) could be interpreted as showing slight differentiation of samples without any geographic pattern evident. However, the very different results in distinctiveness of male specimens from Area 2 (fig. 6) would certainly be given different biological interpretations for the two data sets.

#### *Riverine hypothesis of differentiation*

GASCON *et al.* (1996) used multivariate analyses of morphometric data to determine whether there was a riverine effect on differentiation to compare with a data set derived from allozymic variation. We use our measurement data to address the same question, but in a slightly different way from the GASCON *et al.* (1996) approach.

There are two matched sets of localities immediately across the Rio Juruá available for comparison. Our Group 1 (localities 2+3 of GASCON *et al.*, 1996) is immediately across the river from Group 2 (localities 8+9) and both are geographically separated from Group 3 (localities 4+5), which is immediately across the river from Group 4 (localities 10+11). Groups 1 and 3 are on the same riverbank, as are Groups 2 and 4. If the riverine hypothesis of differentiation were operational, we would predict that there should be less differentiation between Group 1 & 3 and 2 & 4 than between Group 1 & 2 and 3 & 4.

We used raw measurement data for adults and ran discriminant function analyses separately on male and female adult WRH-defined specimens. Each observer data set was used separately and results compared.

The sample size for males is 24 (Group 1  $n = 3$ , Group 2  $n = 5$ ; Group 3:  $n = 4$ , Group 4  $n = 12$ ), for females it is 46 (Group 1:  $n = 10$ , Group 2:  $n = 2$ , Group 3:  $n = 6$ , Group 4:  $n = 28$ ).

We also explore possible differences between discriminant function criteria. The Wilks' criterion finds axes that account for the greatest separation among groups. The Mahalanobis criterion finds axes that maximize pairwise separation of groups. In this case, the Mahalanobis criterion model is more appropriate to test the riverine barrier hypothesis, as we are interested in pairwise differences among the four groups we are analyzing.

For the Mahalanobis pairwise separation criterion, the 0.05 probability level was used rather than the approximate F-level as the cutoff stepwise criterion for entrance and removal of variables. For the Wilks' separation criterion, the approximate F-level for removal/entrance was used.

The results (tab. 7-8) indicate pronounced differences both due to measurement differences and model differences. In no case is the set of variables used in the final model the same for the CG versus WRH measurement data. As a consequence, none of the discriminant function results are the same when the CG data set analyses are compared with the WRH data set analyses. The differences due to model separation criterion differences are of the same magnitude, however. For example, only in the case of the CG male data did the Mahalanobis

Table 7. - Comparison of discriminant function analysis results for male data of *Vanzohinus discodactylus*, testing the riverine hypothesis, using two sets of measurements taken on the same individuals

CG measurements	WRH measurements
Significant univariate F-test SVL Head length Head width Eye-nostril distance Eye width anterior Eye width posterior Tympanum diameter Thigh Shank Foot	Significant univariate F-test SVL Head length Nostril separation Eye-nostril distance Eye length Eye width anterior Eye width posterior Tympanum diameter Thigh Shank Foot Third finger disk width Fourth toe disk width
Mahalanobis criterion, 0.05 probability cutoff	
Stepwise discriminant mode. First variable tried SVL Final model uses SVL Thigh Shank Fourth toe disk width Final model separates all groups	Stepwise discriminant model First variable tried Eye-nostril distance Final model uses SVL Eye-nostril distance Tympanum diameter Foot Third finger disk width Final model separates all groups
Significant canonical axes Three, explaining 100 % of variance	Significant canonical axes Three, explaining 100 % of variance
Overall classification Group      % 1           100 2           100 3           75 4           83 Overall     88	Overall classification Group      % 1           100 2           100 3           100 4           100 Overall     100
Wilks' criterion, approximate F-level cutoff	
Stepwise discriminant model First variable tried Tympanum diameter Final model uses Tympanum diameter Final model cannot separate Group 1 from Group 2 Group 1 from Group 3 Group 2 from Group 3	Stepwise discriminant model First variable tried Tympanum diameter Final model uses SVL Eye-nostril distance Tympanum diameter Foot Third finger disk width Final model separates all groups
Significant canonical axes One, explaining 100 % of variance	Significant canonical axes Three, explaining 100 % of variance
Overall classification Group      % 1           33 2           80 3           0 4           83 Overall     88	Overall classification Group      % 1           100 2           100 3           100 4           100 Overall     100

Table 8 Comparison of discriminant function analysis results for female data of *Vanzolinius discodactylus*, testing the riverine hypothesis, using two sets of measurements on the same individuals

CG measurements	WRH measurements
Significant univariate F-test SVL Head length Head width Nostril separation Eye-nostril distance Eye width anterior Eye width posterior Tympanum diameter Thigh Shank Foot	Significant univariate F-test SVL Head length Head width Nostril separation Eye-nostril distance Eye width anterior Eye width posterior Tympanum diameter Thigh Shank Foot
Mahalanobis criterion, 0.05 probability cutoff	
Stepwise discriminant model First variable tried Thigh Final model uses Tympanum diameter Thigh Third finger disk width Final model cannot separate Group 1 from Group 2 Group 1 from Group 3	Stepwise discriminant model First variable tried Eye-nostril distance Final model uses SVL Eye-nostril distance Tympanum diameter Shank Final model cannot separate Group 1 from Group 2 Group 2 from Group 3
Significant canonical axes Three, explaining 100% of variance	Significant canonical axes Three, explaining 100% of variance
Overall classification Group      % 1            40 2            100 3            83 4            82 Overall     74	Overall classification Group      % 1            60 2            100 3            83 4            96 Overall     87
Wilks' criterion, approximate F-level cutoff	
Stepwise discriminant model First variable tried Thigh Final model uses Thigh Final model cannot separate Group 1 from Group 2 Group 1 from Group 3 Group 2 from Group 3	Stepwise discriminant model First variable tried Tympanum diameter Final model uses Tympanum diameter Final model cannot separate Group 1 from Group 2 Group 1 from Group 3 Group 2 from Group 3
Significant canonical axes One, explaining 100% of variance	Significant canonical axes One, explaining 100% of variance
Overall classification Group      % 1            0 2            100 3            50 4            79 Overall     59	Overall classification Group      % 1            10 2            50 3            33 4            93 Overall     65

Table 9 – Biological interpretations of morphometric data analyses relative to the riverine hypothesis. Distances (i.e., amount of differentiation) based on centroids for first or first and second canonical functions. S, data set supports prediction; R, data set rejects prediction;  $\pm$ , equivocal

Data set	Predictions	
	Group 1&3 distance < 1&2 distance	Group 2&4 distance < 3&4 distance
♂ Wilks' criterion, CG	S	S
♂ Wilks' criterion, WRH	R	R
♂ Mahalanobis criterion, CG	R	$\pm$
♂ Mahalanobis criterion, WRH	R	$\pm$
♀ Wilks' criterion, CG	S	R
♀ Wilks' criterion, WRH	R	R
♀ Mahalanobis criterion, CG	S	R
♀ Mahalanobis criterion, WRH	R	R

criterion and Wilks' criterion models try the same variable first (thigh). In all other cases, different variables were tried first under the two model criteria.

As the statistical results for these data (tab. 7-8) are quite different, it is no surprise that their biological interpretations also differ. There are differences of whether the results support or reject the predicted pairwise differences among the four groups (tab. 9), not only due to measurement differences, but to model criteria as well. It should be noted that this data set is not as large as one would like to have strong confidence in the statistical model results. However, for demonstrating inter-observer and inter-model effects, it is adequate.

#### INTRA-OBSERVER DATA

The impact of individual measurement error in making biological interpretations of the data is difficult to assess in general, but can be done within the context of specific analyses. We examine the repeated measurements in the context of the male discriminant analysis of geographic variation as an illustration. The 20 remeasurement values were incorporated into the analysis but not for the production of the original discriminant function model. The results were incorporated only in the final classification stage. The canonical discriminant scores were plotted on the first two canonical axes (fig. 7). The results indicate that the remeasurement variability can compromise the biological interpretation of the results. For example, if the polygon encompassing the variation exhibited by the 20 remeasurements on fig. 7 were transferred to the specimen at the top of the polygon encompassing individuals from Area 2, the intra-individual measurement differences would then bridge the gap between the polygons encompassing individuals from Areas 2 and 4. It is likely that without the estimate of individual measurement error, the results would be interpreted as Area 2 being distinct from a combination of Areas 1, 3 and 4. With the estimate of individual measurement



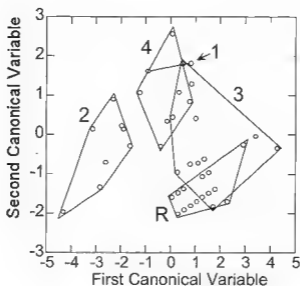


Fig. 7 Discriminant function analysis results for male *Van-olimus discobactylus*, by geographic Areas 1-4 (see text for definition of areas), WRH measurements, with re-measurement data (R) plotted (re-measurement data incorporated only at final classification stage)

error, the results would be interpreted as all four areas demonstrating modest differentiation from each other, with no real distinctions among them.

We inadvertently found that statistical results vary among versions of the same statistical package. Fig. 7 was produced from SYSTAT version 7 (ANONYMOUS, 1997), fig. 6 was produced from SYSTAT version 9 (ANONYMOUS, 1999). Note the different polygon shapes in fig. 6 (right) and fig. 7, which preferably should be identical (excluding the re-measurement polygon in fig. 7).

#### CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

Intra- and inter-observer differences in recording frog measurement data can lead to statistically significant differences in the variables. Because of the soft and flexible nature of preserved frogs, measurements cannot be made with great precision, even by the same individual.

Statistical modeling results of intra- and inter-observer differences in measurements may well result in different biological interpretations, as demonstrated in this study.

The criteria chosen (for example, Mahalanobis or Wilks) for discriminant function analysis can give different results for the same data, which in some cases would lead to

different biological interpretations. Researchers should be aware that either using the default option or the only option available in any given discriminant function analysis software program package may not be the most appropriate option for their data.

Bearing the above in mind, together with other general results discussed in this paper, we offer the following recommendations:

(1) Use of eye length as a morphometric variable should be tested for measurement precision before being used in a study. We recommend against using eye length lacking such testing.

(2) Select the most appropriate statistical model options for the data being analyzed. Different model options do give different results.

(3) Assume measurement differences between sexes in frogs and analyze data separately by sex. Combine male, female and juvenile data only after statistical validation that it is appropriate to do so.

(4) It is appropriate to include variables that are smaller (in terms of measurement length) with larger variables in multivariate analyses of frog morphometric data.

(5) Pseudo-precision, while statistically and biologically indefensible, does not have a meaningful impact on multivariate analyses of frog morphometric data. While we recommend avoidance of pseudo-precision, there is no need to discredit studies characterized by pseudo-precise data.

(6) Because frog measurements are not precise, but approximate, any biological inferences drawn from morphometric analyses of frogs must be based only on very robust effect size estimates and differences. With the use of even large or moderately large sample sizes only the most conservative interpretations of the analyses should be made.

(7) Do not rush to logarithmic transformation. Measured morphological variables can serve biology well without transformation. Scatter plots, histograms and comparisons with the best-fitting normal distribution are tools to determine whether transformation is necessary or not.

(8) At least one individual in a frog study should be remeasured a number of times. These remeasures should be included in analyses in the manner shown in fig. 7.

HAYEK & BUZAS (1997) deal with the issue of adequate sample size. They demonstrate (1997: 66-69) that without any prior knowledge of the distribution or of any population characteristics, a sample size of 20 will always be adequate. Intuitively, a minimum sample size for characterizing 95% confidence on measurement error should be less than 20 individuals. HAYEK & BUZAS (1997: 69-70) discuss how assuming a normal distribution can reduce the adequate sample size below 20. However, from a statistical perspective, because repeated measurements by a trained observer will result in a relatively extreme variance estimate, the alternative sample size estimates discussed by Hayek and Buzas will result in a size of less than one individual. We therefore are left with the recommendation of a sample size of 20 remeasurements of a specimen for estimation of intra-individual measurement error unless or until a measurement effect size is repeatedly calculated and comes into general use in the frog research community.

## ACKNOWLEDGMENTS

Kay Bradfield, James Cook University, and George R. Zug, Amphibians & Reptiles, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, critically reviewed the manuscript

WRH thanks support from the Neotropical Lowland Research Program, Smithsonian Institution, Dr. Richard P. Vari, Principal Investigator

## LITERATURE CITED

- ANONYMOUS, 1995 - *BESTFIT, 1995*. New York, Newfield, Palisade Corporation
- 1997 - *SYSTAT 7 Statistics*. Chicago, Illinois, SPSS, Inc
- 1998 - *SPSS version 8.0*. Chicago, Illinois, SPSS, Inc
- 1999 - *SYSTAT 9 Statistics I*. Chicago, Illinois, SPSS, Inc
- BENSON, R. H., HAYEK, L. C., HODELL, D. A. & RAKIC-EL BIED, K., 1995 - Extending the climatic precession curve back into the Late Miocene by signature template comparison. *Paleoceanography*, **10**: 5-20
- DELAUGERRE, M. & DUBOIS, A., 1985 - La variation géographique et la variabilité intrapopulationnelle chez *Phyllodactylus europaeus* (Reptilia, Sauria, Gekkonidae). *Bull Mus nat Hist nat*, (4), **7**(A) (3): 709-736
- GASCON, C., LOUGHEED, S. C. & BOGART, J. P., 1996 - Genetic and morphological variation in *Vanzolmus discodactylus*: a test of the river hypothesis of speciation. *Biotropica*, **28**: 376-387.
- GREEN, D. M., KAISER, H., SHARBEL, T. F., KEARSLEY, I. & McALLISTER, K. R., 1997. Cryptic species of spotted frogs, *Rana pretiosa* complex, in western North America. *Copeia*, **1997**: 1-8.
- HAYEK, L. C. & BUZAS, M. A., 1997. *Surveying natural populations*. New York, Columbia University Press: i-xvii + 1-563
- HEYER, W. R., 1997 - Geographic variation in the frog genus *Vanzolmus* (Anura: Leptodactylidae). *Proc Biol. Soc. Washington*, **110**: 338-365
- LEE, J. C., 1982 - Accuracy and precision in anuran morphometrics: artifacts of preservation. *Syst Zool*, **31**: 266-281.
- 1990 - Sources of extraneous variation in the study of meristic characters: the effect of size and of inter-observer variability. *Syst. Zool*, **39**: 31-39.
- PAGANO, A. & JOLY, P., 1999. - Limits of the morphometric method for field identification of water frogs. *Alytes*, **16**: 130-138
- SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J., 1969 *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. San Francisco, W H Freeman & Co.: i-xxi + 1-776.
- THORPE, R. S., 1975. - Quantitative handling of characters useful in snake systematics with particular reference to intraspecific variation in the ringed snake *Natrix natrix* (L.). *Biol J Linn Soc*, **7**: 27-43
- 1976 - Biometric analysis of geographic variation and racial affinities. *Biol Rev*, **51**: 407-452
- YEZERINAC, S. M., LOUGHEED, S. C. & HANDFORD, P., 1992 - Measurement error and morphometric studies: statistical power and observer experience. *Syst. Biol*, **41**: 471-482.

Corresponding editor: Alain DUBOIS.

# **Redescription of the tadpole of *Phlyctimantis boulengeri* Perret, 1986 (Anura, Hyperoliidae) with preliminary comments on the biology of the species**

Mark-Oliver RÖDEL & Raffael ERNST

Theodor-Boveri-Institute (Biocenter of the University),  
Department of Animal Ecology and Tropical Biology (Zoology III),  
Am Hubland, 97074 Würzburg, Germany  
[roedel@biozentrum.uni-wuerzburg.de]

**We redescribe the tadpole of *Phlyctimantis boulengeri* Perret, 1986 based on specimens from Tai National Park, Ivory Coast. The tadpoles resemble very much those of the genus *Kassina*. We found no hints for arboreal spawning, as described by GUIBÉ & LAMOTTE (1958) for this species. Eggs were laid singly below the surface of water. Adults showed a conspicuous defence behaviour.**

## INTRODUCTION

In 1986, PERRET separated the West African and Cameroon specimens of *Phlyctimantis leonardi* (Boulenger, 1906) from those of Gabon describing the western forms as *Phlyctimantis boulengeri*. According to SCHIOTZ (1999), two distinct forms of *P. boulengeri* exist. The eastern one occurs in Cameroon and eastern Nigeria, the western one is in Ivory Coast and Liberia. Our specimens from Tai National Park, Ivory Coast, fit SCHIOTZ's description of the western form. In 1958, GUIBÉ & LAMOTTE published a description of a tadpole which they named *Hylambates leonardi*. While their adult voucher specimens are *P. boulengeri*, the tadpole they described was *Chromantis rufescens* (Günther, 1868) (LAMOTTE & PERRI, 1963; SCHIOTZ, 1975). LAMOTTE & PERRI (1963) noted that the tadpole descriptions of *C. rufescens* and *P. boulengeri* given by GUIBÉ & LAMOTTE (1958) were simply reversed (this was already clarified in the errata added to the latter paper). This view was accepted by SCHIOTZ (1975), DREWS (1984) and ALTIG & McDIARMID (1999). GUIBÉ & LAMOTTE (1958) described arboreal spawning in both species, although this is clearly not the case in *P. boulengeri*. Their drawings figure a tadpole that still possesses external gills and the oral disc of a certainly much older specimen. An identification of *P. boulengeri* tadpoles seems impossible with their description, even if it was based on that species. We present a description based on older tadpoles of known parents.

## MATERIALS AND METHODS

## STUDY AREA

Our study area was in the Tai National Park (6°10'-5°10'N, 7°20'-6°50'W), Ivory Coast. This is the largest protected rain forest area in West Africa. Annual precipitation reaches 2,200 mm in the south-west and 1,700 in the northeast of the park. Precipitation is highest from April-May to June-July and from September to October-November. A first dry period lasts from December to February. A second dry period normally occurs in August. Temperatures vary between 20 and 33°C, daily temperature differences are up to 10°C. Mean annual temperature is about 25°C. Humidity fluctuates from 85% during day to 90-100% during night. This area is situated within the equatorial climate zone which is influenced by the southern passat (RITZEBOS et al., 1994). Floristically it belongs to the Guinea-Congo Region (GUILLAUMET, 1967). Our main investigation area was located about 23 km southeast of the small town of Tai and comprises an area of about 30 km<sup>2</sup> around the SRET station (Station de Recherche en Ecologie Tropicale; 05°50.003'N, 007°20.536'W). Precipitation at the SRET was 1,820 mm in 1999. Field data were collected from January to May and August to December in 1999 and March to October 2000.

## REARING

In 1999, we got fertilised eggs from an amplexant pair of *Phlyctimantis bouleengeri* (SMNS 9271.1-2). All tadpoles were reared in plastic aquaria (PT2 Firma Hoch, 25 × 15 cm, 16 cm water depth), filled with rain water and fed ad libitum with commercial fish food (TetraMin<sup>®</sup>). Water was changed every second to third day. In 1999 the tadpoles had not reached metamorphosis before our field season was finished. Therefore the most advanced tadpole of that series had only reached stage 32 after GOSNER (1960). In 2000 we collected tadpoles of more advanced stages but unknown age in two rock-pools on an inselberg, surrounded by primary rain forest.

## PRESERVATION AND DESCRIPTIVE METHODS

Tadpoles of various developmental stages were preserved in 4% formaldehyde. As, according to our experience, developmental time of West African tadpoles, even under best rearing conditions, is always slower in captivity than in the field (RÖDEL, 1998), we do not give developmental time tables. We only preserved tadpoles that already swam. All collected specimens, including the tadpoles' parents, are deposited in the collection of the Staatliches Museum für Naturkunde Stuttgart (SMNS). In total we preserved 18 specimens (stage 25-42, SMNS 9271.3-20). Staging is according to GOSNER (1960). Nomenclature of morphological features is combined after VAN DIJK (1966), ALTIJ & JOHNSTON (1989) and ALTIJ & McDIARMID (1999). The keratodont formula is after DUBOIS (1995). Measurements were

taken with dial callipers ( $\pm 0.5$  mm) or with a measuring ocular at a dissecting ( $\pm 0.1$  mm, Zeiss® Stemi SV 6) or compound microscope ( $\pm 0.01$  mm, Leitz® Laborlux S), respectively. Drawings were done with the aid of a camera lucida. We noted coloration of several dozen live *P. boulengeri* tadpoles and then released them in their natural ponds. The tadpole description is mainly based on specimens of the Gosner stages 27-28 (tab. 1). Data are given for all preserved tadpoles.

## RESULTS

### TADPOLE DESCRIPTION

Compact body, oval but compressed viewed dorsally (fig. 1a-b), body length 1.5 (1.2-1.9) times body width (measured at the plane of eyes); tail about two times (1.7-2.5) as long as body, more or less straight, if extrapolated, the axis of the tail passes dorsal to the eyes; tail with high fins, fin height 1.1 times body height, highest point of dorsal fin at the same level as highest point in ventral fin, dorsal fin originating anterior to dorsal tail-body junction, dorsal and ventral fin evenly curved along the first 2/3 of tail length, then evenly converging; small oral disc anteroventral (fig. 2a), bordered by a multiple row of papillae that has a rostral gap, additional papillae groups occurring in the oral angles; jaw sheaths very powerful and black; upper jaw sheath uniformly U-shaped; lower jaw sheath deeper than wide, V-shaped, edges of both jaw sheaths slightly serrated, labial tooth row formula 1/2+2.1, supra-angular labial teeth positioned on a bulging lip, infra-angular labial teeth positioned on separate skin folds; third infra-angular tooth row always very short, labial teeth multidenticulate, four times as long as wide (fig. 2b); nostrils dorsal (in stages 25-28 hardly visible), internasal distance as long as distance eye-nostril, distance nostril-snout tip 0.7 times the distance nostril-eye; eyes lateral; spiracle sinistral, visible from dorsal; vent opening medially in basicaudal position. In the two tadpoles of stage 40 and 41, a narrow groove stretches from the nostrils to the eyes. Measurements and ratios of the preserved tadpoles are summarised in tab. 1. Two especially large, uncollected tadpoles measured respectively 63 mm TL (stage 36), and 21 mm BL and 52 mm TL (stage 43). Older stages developed an increasingly elongated body (stage to BL/BW: Spearman rank,  $r_s = 0.459$ ,  $P = 0.055$ ,  $n = 18$ , for abbreviations see tab. 1). Larger tadpoles had comparatively higher fins (TL to FH,  $r_s = 0.982$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 18$ ), but comparatively more flattened bodies (stage to BL/FH,  $r_s = 0.946$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 18$ ). The anterior region of the caudal muscles in stages more advanced than 26 was obscured by connective tissue giving the appearance of a more muscular tail. The basic colour of all investigated tadpoles is dark grey to black (fig. 1a-b). The fin is always transparent. The ventral parts of body and tail are slightly clearer coloured than the dorsal ones, or mottled black.

### BIOLOGY

We never detected any *P. boulengeri* even during rainy weather – from January to May. In 1999, we found choruses on two ponds from September to the beginning of October. In

Table 1 Measurements (mm) and ratios of 18 *Phlyctimantis houlengeri* tadpoles (SMNS 9271.3-20) Staging after GOSNER (1960) BL, body length, AL, tail axis length, TL, total length, BW, body width, BH, body height, FH, fin height (including dorsal and ventral part of fin and muscular portion of tail); KF, keratodont formula (after DUBOIS, 1995)

Stage	BL	AL	TL	BW	BH	FH	BL/BW	AL/BL	BL/FH	TL/FH	KF
25	5.2	9.5	14.7	3.7	3.9	4.3	1.4	1.8	1.2	3.4	1/2+2:1
25	5.4	10.2	15.6	3.9	4.3	4.8	1.4	1.9	1.1	3.3	1/2+2:1
25	5.3	9.9	15.2	3.8	4.1	4.6	1.4	1.9	1.2	3.3	1/2+2:1
25	5.1	9.6	14.7	3.8	4.0	4.3	1.3	1.9	1.2	3.4	1/2+2:1
25	4.9	10.0	14.9	3.6	3.6	4.2	1.4	2.0	1.2	3.5	1/2+2:1
25	7.4	15.1	22.5	5.1	5.2	5.5	1.5	2.0	1.3	4.1	1/2+2:1
26	9.0	21.2	30.2	7.4	7.5	7.3	1.2	2.4	1.2	4.1	1/2+2:1
26	9.2	19.5	28.7	6.1	5.9	6.5	1.5	2.1	1.4	4.4	1/2+2:1
26	8.6	17.8	26.4	6.0	6.5	7.0	1.4	2.1	1.2	3.8	1/2+2:1
27	10.6	21.5	32.1	7.5	7.8	7.4	1.4	2.0	1.4	4.3	1/2+2:1
27	10.6	21.5	32.1	6.9	7.5	7.1	1.5	2.0	1.5	4.5	1/2+2:1
27	10.8	18.1	28.9	6.6	6.8	6.9	1.6	1.7	1.6	4.2	1/2+2:1
28	10.6	22.2	32.8	7.3	7.3	8.0	1.5	2.1	1.3	4.1	1/2+2:1
31	11.5	24.4	35.9	7.6	8.1	8.4	1.5	2.1	1.4	4.3	1/2+2:1
31	14.2	24.6	38.8	7.4	8.1	8.7	1.9	1.7	1.6	4.5	1/2+2:1
32	14.5	27.5	43.0	7.7	8.0	8.5	1.9	1.9	1.7	5.1	1/2+2:1
40	17.0	43.0	60.0	13.0	14.0	15.0	1.3	2.5	1.1	4.0	1/2+2:1
42	18.0	41.0	59.0	12.0	12.0	11.5	1.5	2.3	1.6	5.1	1/2+2:1

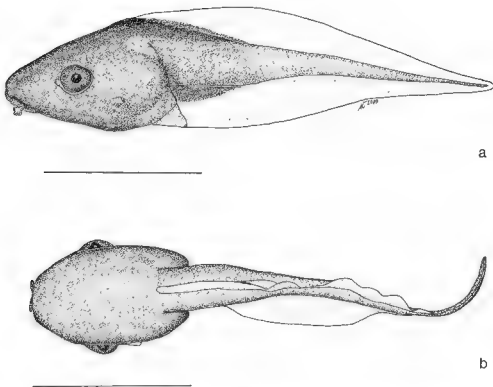


Fig 1 - Lateral (a) and dorsal (b) view of a *Phlyctonantis bouleengeri* tadpole from Tai National Park, Ivory Coast (Gosner stage 28). Scale bar: 10 mm,

2000, we found the first chorus on June 2, after heavy rainfalls. The choruses comprised 5-20 males, all sitting in small trees and bushes at the edge of temporary ponds. Two ponds were situated in the forest, along an old logging road (pond diameter 15-30 m, maximal water depth 40-100 cm). Two other ponds were situated on a rocky inselberg (pond diameter 2 m, maximal water depth 20 cm). When disturbed, all adult *P. bouleengeri* showed a conspicuous defence behaviour. They bent their back, hiding their head between the forelegs, and presented the red parts of the hind limbs (fig. 3). The animals secreted a sticky substance that covered their skin. On September 17, 1999, at 9:00 p.m., two hours after a heavy rainfall, we observed three amplectant pairs of *P. bouleengeri*. The pairs were floating close to the edges of a large pond that had filled during the preceding days (fig. 4). When the frogs were disturbed they retreated to deeper sections of the pond, and re-appeared a few minutes later. We caught one pair (SVL: male 42 mm, female 52 mm) and transferred it to a plastic aquarium where they spawned the same night. The eggs were attached singly to the aquarium walls below the water surface. The clutch comprised 185 eggs. The ovum size was 2-2.5 mm (3-3.5 mm including the jelly capsule,  $n = 20$ ), they had a small black and a large yellow pole. The first tadpoles hatched on September 26. On November 25, we preserved the last five tadpoles of



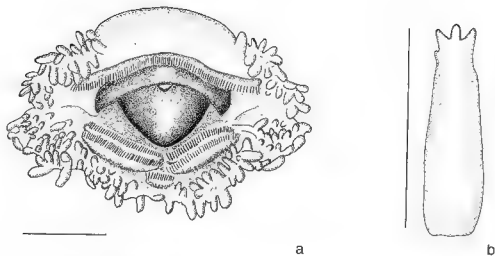


Fig 2 - Oral disc (a) and single infra-angular labial tooth (b) of the specimen figured in fig 1. Scale bar a, 1 mm, b, 0.1 mm

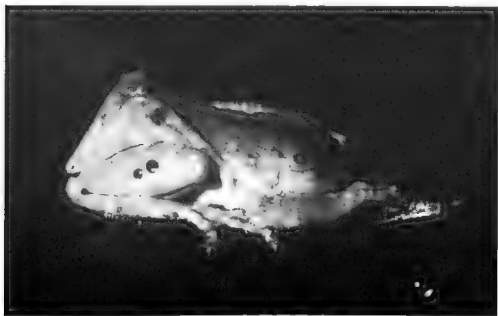


Fig 3. - Defence behaviour of an adult male *Phlyctimantis bouleengeri*



Fig. 4 Amplexant *Phlyctmantis boulengeri* pair floating in shallow water of a large forest pond.

our 1999 series (stages 27-32). Three other clutches that we got from amplexant pairs (SVL: males 43-48 mm, females 51.5-54 mm) in June and September 2000 comprised 110, 210 and 339 eggs, respectively. Egg colour, egg size and time until hatching was equal to that of the first clutch. In the ponds, eggs were attached to the pond bottom or to rotten leaves.

## DISCUSSION

An identification of *Phlyctmantis boulengeri* tadpoles with the description given by GUIBÉ & LAMOTTE (1958) under the name *C. rufescens* is not possible. These authors pictured a tadpole with external gills and an oral disc that clearly belongs to a much older specimen. The given keratodont formula fits nearly the formula of our tadpoles (they figured 1/1 + 1.2), but the fact that they reported *P. boulengeri* to deposit its eggs on leaves above the water surface leaves doubt concerning the correct identification of their specimens. According to our observation, *P. boulengeri* lays its eggs in the water. The same behaviour was described by LAURENT (1976) for *Phlyctmantis verrucosus* (Boulenger, 1912).

SCHEIFF (1975) described the tadpole of *P. verrucosus*. According to his description the tadpoles resemble our *P. boulengeri*. He indicated the keratodont formula of his two specimens as being 1/3 and 1/2 + 2.1. The fin of these tadpoles is rather high, but not as high as in

*Kassina* Girard, 1853 ALTIG & McDIARMID (1999) characterised the species as exotroph, lentic and benthic. The body pattern is described as uniformly pale with blotches. Our tadpoles fit this ecological characterisation. They closely resemble the tadpoles of *Kassina fusca* Schiøtz, 1967 with transparent fins (RÖDEL, 2000). This might be a further hint for the supposed close relationship of *Kassina* with *Phlyctimantis* Laurent & Combaz, 1950 (DREWES, 1984). However, this could be also a plesiomorphic character. To clarify the phylogenetic relationship of *Kassina* and *Phlyctimantis* we propose a closer examination of their genetic and call characters.

SCHIÖTZ (1999) wrote that all four currently recognised *Phlyctimantis* species require forest conditions at their breeding localities. According to SCHIÖTZ (1975) and LAURENT (1976), in eastern Zaire and Uganda the breeding sites of *P. verrucosus* were small stagnant, probably temporary pools in very dense forests. Males of *P. boulengeri* called in vast numbers around small waterholes in forest and sometimes in bushland (SCHIÖTZ, 1975). PERRÉ (1966) reported that *P. leonardi* occurs near rivers in forests of low altitude in Cameroon. Males of *P. leonardi* from the Republic of Congo called from elevated (1–2.5 m) positions in large bushes at the edge of deep, but temporary ponds (LARGEN & DOWSETT-LEMAIRE, 1991). These males called from bushes in flooded grassland, but not from the nearby flooded forest. *Phlyctimantis keithae* Schiøtz, 1975 from Tanzania called around artificial ponds in very open farmland (SCHIÖTZ, 1999). The males were concealed in grass-tufts near the water's edge and quietly slipped into the water if disturbed. All our *P. boulengeri* records lay within or in close vicinity to forest habitats. However, we never found that species within closed primary forest. The breeding sites were all in degenerated forest or in habitats without a closed canopy. We detected calling males of *P. boulengeri* exclusively in small trees and shrubs in close vicinity to their breeding ponds. It might therefore be concluded that *Phlyctimantis* species most often require forest habitats, but avoid closed primary forest.

Disturbed *P. boulengeri* displayed a conspicuous defence behaviour. During that behaviour their skin turned very sticky. DREWES & VINDUM (1994) reported a similar observation on *P. verrucosus*. Their specimens were covered with a latex-type liquid which had a rather noxious smell. The biological significance of this behaviour and the chemical nature of the secretions need further investigations.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

MOR was supported by a scholarship of the German Academic Exchange Service (DAAD). TROPENBOS Côte d'Ivoire provided transportation and various administrative services. Lodging facilities were provided by the "Centre de Recherche en Ecologie". The research permission was given by the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique", Republic of Ivory Coast. Access permit to TNP was issued by the "Ministère de la Construction et de l'Environnement". Ronn Altig, Alain Dubois, Heinz Grillitsch and two anonymous reviewers provided valuable comments on a previous draft of the manuscript. These supports are gratefully acknowledged.

## LITERATURE CITED

- ALTIG, R. & JOHNSTON, G. F., 1989. Guilds of anuran larvae: relationships among developmental modes, morphologies and habitats. *Herp. Mon.*, **3**, 81-109.
- ALTIG, R. & MCDIARMID, R. W., 1999. Diversity: familial and generic characterizations. In R. W. MCDIARMID & R. ALTIG (ed.), *Tadpoles: the biology of anuran larvae*, Chicago, Illinois, Univ. Chicago Press, 295-337.
- DREWES, R. C., 1984. A phylogenetic analysis of the Hyperoliidae (Anura) treefrogs of Africa, Madagascar, and the Seychelles Islands. *Occ. Pap. Calif. Acad. Sci.*, **139**: 1-70.
- DREWES, R. C. & VINDUM, J. V., 1994. Amphibians of the impenetrable forest, southwest Uganda. *J. Afr. Zool.*, **108**: 55-70.
- DUBOIS, A., 1995. Keratodont formulae in anuran tadpoles: proposals for a standardization. *J. Zool. Syst. Evol. Research*, **33**: I-XV.
- GOSNER, K. L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, **16**: 183-190.
- GUIBÉ, J. & LAMOTTE, M., 1958. La réserve naturelle intégrale du Mont Nimba. XII Batraciens (sauf *Arthroleptis*, *Phrynobatrachus* et *Hyperolius*). *Mem. Inst. fond. Afr. nove* **53**: 241-273.
- GUILLIAT MET, J.-L., 1967. Recherches sur la végétation et la flore de la région du Bas-Cavally (Côte d'Ivoire). *Mem. ORSTOM*, **20**, 1-247, 15 pl.
- LAMOTTE, M. & PERRÉ, J.-L., 1963. XIV Le développement larvaire de *Chiromantis rufescens* GÜNTHER. *Bull. Inst. fond. Afr. noire.*, **25** (A): 265-275.
- LARGEN, M. J. & DOWSETT-LEMAIRE, F., 1991. Amphibians (Anura) from the Kouloja River basin, République du Congo. *Tauraco Research Report*, **4**: 145-168.
- LAURENT, R. F., 1976. Les genres *Cryptothylax*, *Phlyctimantis* et *Kassina* au Zaïre. *Mus. Afr. centr.* (sér. in-8), **Sci. zool.**, **213**, 1-67.
- PERRÉ, J.-L., 1966. Les amphibiens du Cameroun. *Zool. Jh. (Syst.)*, **8**, 289-464.
- 1986. Considerations sur le genre *Phlyctimantis* Laurent et Combaz (Anura, Hyperoliidae). *Mus. Hist. nat. Genève*, **109**: 9-26.
- RIEZEBOIS, E. P., VOORJEN, A. P. & GUILLIAT MET, J. L., 1994. *Le Parc National de Taï, Côte d'Ivoire*. Wageningen, Tropenbos Series 8.
- RÖDEL, M.-O., 1998. *Kaulquappengemeinschaften ephemerer Savannengewässer in Westafrika*. Frankfurt-am-Main, Edition Chimaira: 1-195.
- 2000. *Herpetofauna of West Africa*. Vol 1. *Amphibians of the West African Savanna*. Frankfurt-am-Main, Edition Chimaira: 1-335.
- SCHIÖTZ, A., 1975. *The treefrogs of Eastern Africa*. Copenhagen, Steenstrupia: 1-232.
- 1999. *Treefrogs of Africa*. Frankfurt-am-Main, Edition Chimaira: 1-350.
- VAN DIJK, D. E., 1966. Systematic and field key to the families, genera and described species of Southern African anuran tadpoles. *Ann. Natal Mus.*, **18**, 231-286.

Corresponding editor: Alain DUBOIS

## Microanatomía del aparato bucal y cavidad bucofaringea de la larva de *Alsodes gargola* Gallardo, 1970 (Leptodactylidae, Telmatobiinae)

DINORAH D. ECHEVERRÍA \*, CECILIA A. ALONSO \*\*,  
MARÍA SUSANA PILLADO \*\* & CARMEN A. ÚBEDA \*\*

\* Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (U. BA), Departamento de Ciencias Biológicas,  
Laboratorio de Vertebrados, (1428) Buenos Aires, Argentina  
{echeverria@bg.fcen.una.ar}

\*\* Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue,  
Unidad Postal Universidad, (8400) San Carlos de Bariloche, Argentina  
{cubeda@bariloche.com.ar}

Based on specimens collected in Provinces Neuquén and Río Negro (Argentina), the microanatomy of the buccal apparatus and the buccopharyngeal cavity of *Alsodes gargola* larvae are described as observed with light and scanning electron microscopy. The buccal apparatus has keratodonts formed by a long base, a short neck, and a multicusped paddle, with 14 to 20 denticles. The horny beak is wider than high, and the rostrodonts are unicusped with the tips sharply pointed with smooth margins. The buccopharyngeal cavity has two pairs of infralabial papillae and one single prenarial papilla. Papillae and pustulations are present on both oral floor and roof. Lateral ridges with digitiform projections of different length are present. The velum and glandular zone are located in posterior area. The tongue anlage possesses from 2 to 4 papillae and the median ridge can have distal projections. Though both larvae have the same papillae pattern arrangement in the buccal cavity, labial papillae of *Alsodes gargola neuquensis* are longer and thinner than those of *Alsodes gargola gargola*. The comparative analysis of the microanatomy of the buccopharyngeal cavity of *A. gargola* and other species of telmatobiines, which inhabit the temperate forests of Patagonia, shows similarities with other free-living larvae, especially those belonging to the genus *Batrachyla*. Mainly epilithic and periphytic diatoms were found in the digestive contents, corresponding to anatomical structures of larvae that forage at the bottom of water bodies.

### INTRODUCCIÓN

El género *Alsodes* contiene 12 especies distribuidas en Argentina y Chile (LAVILLA, 1992, 1994, FORMAS, 1995, FORMAS et al., 1997, 1998). GALLARDO (1970) describió a *Alsodes gargola* con ejemplares provenientes de la laguna Tonchek en el Cerro Catedral (41°12'S, 71°30'W, 1750 m s. n. m., Parque y Reserva Nacional Nahuel Huapi, Argentina). Esta especie, endémica

del noroeste patagónico, hasta el momento solo citada para Argentina, habita cuerpos de agua permanentes lénticos de altura y lóticos de montaña, hasta los 2000 metros de altitud (ÚBEDA et al., 1998). CUI (1976) propuso la existencia de dos subespecies, *Alsodes gargola gargola* para la localidad tipo y *Alsodes gargola neuquensis* para una nueva forma proveniente de la Meseta de Lonco Luan (provincia de Neuquén, Argentina)

La morfología externa de la larva de *Alsodes gargola* fue descrita por PILLADO et al. (2000) sobre ejemplares provenientes del Parque y Reserva Nacional Nahuel Huapi. Hasta el presente se ha descrito la microanatomía bucofaringea de las larvas de *Alsodes barrios* y *Alsodes monticola* (WASSERSUG & HUYER, 1988). De acuerdo con las investigaciones previamente realizadas por ÚBEDA (1998), que señalan la falta de información que existe actualmente en diversos aspectos de la historia de vida de los anuros patagónicos, comenzamos el estudio de las larvas desde el punto de vista de la anatomía del aparato bucal externo e interno. En este trabajo se describe la conformación anatómica del piso y del techo de la cavidad bucofaringea de la larva de *Alsodes gargola* y se amplía la descripción del disco oral.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron larvas de *Alsodes gargola gargola* (sensu CUI, 1976) en el Valle de los Perdidos y Cerro Challhuaco (Parque y Reserva Nacional Nahuel Huapi, Provincia de Río Negro, 1997 y 1998) y larvas de *Alsodes gargola neuquensis* (sensu CUI, 1976) en La Atravesada (Provincia del Neuquén, 1999). Se determinó la posición geográfica de las localidades de muestreo por medio de las cartas del Instituto Geográfico Militar a escala 1:50 000, a saber Valle de los Perdidos, 41°14'32" S, 71°16'7,4" W; Cerro Challhuaco, 41°15'59" S, 71°18'25" W. La Atravesada, 38°52'S, 70°34'W. Las larvas se capturaron con redes de mano, se anestesiaron con benzocaina en solución acuosa y se fijaron in toto en formalina 10% neutra. Los estadios larvarios se determinaron estableciendo una equivalencia con la tabla propuesta por GOSNER (1960). Para detectar las posibles variaciones en la fórmula dentaria de la larva de *Alsodes gargola*, se examinaron 20 ejemplares de *A. gargola gargola* y 10 de *A. gargola neuquensis*. Para realizar el examen del disco oral con microscopio electrónico de barrido, se extrajo esta estructura previamente a su deshidratación. La descripción de las estructuras bucofaringeas se realizó con 12 especímenes de *Alsodes gargola gargola* y ocho de *A. gargola neuquensis* comprendidos entre los estadios 26 y 37. De estos ejemplares, cuatro de *A. gargola gargola* y cinco de *A. gargola neuquensis* se destinaron para ser observados con microscopio electrónico de barrido (estadios 31 y 37 en ambas taxa). Todos los especímenes utilizados formaron parte del lote 1, de la colección de Vertebrados de la Universidad Nacional del Comahue, Río Negro, que se detallan en la tabla 1.

La disección de la cavidad oral se realizó siguiendo la técnica sugerida por WASSERSUG (1980). Para las observaciones con microscopio estereoscópico, se coloreó la superficie del piso y del techo de la cavidad bucofaringea con dos o tres gotas de hematoxilina de CARAZZI o con azul de metileno acuoso al 1%. El disco oral, el piso y el techo de la cavidad bucofaringea destinados para la observación con microscopio electrónico de barrido fueron deshidratados con alcoholes de graduación creciente, según la técnica propuesta por FIORITO DI LÓPez & ECHIVERRIA (1984), a la cual se le modificó el tiempo de deshidratación en alcohol etílico

Tabla 1 Material de *Alsodes gargola* estudiado (colección de Vertebrados de la Universidad Nacional del Comahue, lote 1).

Taxón	n	Estadio								
		26	27	28	29	31	32	34	36	37
<i>Alsodes gargola gargola</i>	12	–	–	–	2	2	3	2	2	1
<i>Alsodes gargola neuquensis</i>	8	1	2	2	–	–	–	–	–	3

(80 %, 8 h, 96 %, 2 h; 100%, 1 h), en la mezcla alcohol etílico-acetona (3.1, 1h; 1:1, 1h, 1:3, 1h) y en acetona pura donde permanecieron como máximo dos horas antes de proceder a la desecación final. Las piezas se secaron al vacío con un secador Balzers CPD 030 hasta alcanzar el punto crítico de desecación y se metalizaron con oro en un metalizador ION Sputtering Balzers SCD 040. Las observaciones se realizaron con un microscopio electrónico de barrido Philips 505.

La terminología utilizada para la descripción de la anatomía del aparato bucal externo fue la sugerida por VAN DIJK (1966); para las estructuras corneas se utilizó la propuesta por DEUNH & BEAUMONT (1959); la terminología para la descripción de la cavidad bucofaringea se ajustó a la presentada por VIERTEL (1982), siguiendo las sugerencias de McDIARMID & AL TIG (1999). La fórmula dentaria se expresó según DUBOIS (1995). Las ilustraciones fueron realizadas con microscopio estereoscópico Carl Zeiss provisto de cámara clara Carl Zeiss BH2-DA 2148.

Para determinar cualitativamente la composición del contenido intestinal de la larva, se examinó el primer tercio del intestino de seis ejemplares fijados, comprendidos entre los estadios 28 y 37. Para la identificación taxonómica se utilizó un microscopio invertido Hydro-BIOS y se consultó principalmente a GERMAIN (1981) y SMITH (1950).

Las características de la cavidad bucofaringea de la larva de *Alsodes gargola* fueron comparadas con las características de *Alsodes burrioi* y *Alsodes monticola* y con las de otras especies de telmatobinos cuyas cavidades bucofaringeas han sido descritas: *Atelognathus patagonicus*, *Atelognathus reverberii*, *Batrachyla antartandica*, *Batrachyla leptopus*, *Batrachyla tuenata*, *Caudiverbera caudiverbera*, *Hylorina sylvatica*, *Telmatobius jelskii*, *Telmatobius marmoratus*, *Thoropa multiaris* y *Thoropa petropolitana* (BRILVA VÁSQUEZ, 1988, WASSERSUG & HEYER, 1988).

## RESULTADOS

### DESCRIPCIÓN DEL APARATO BUCAL

El aparato bucal está en posición subterminal ventral. El disco oral presenta constricciones (emarginado) y un amplio claro rostral, una hilera de papilas marginales, una hilera de papilas intramarginales mentomianas y papilas intramarginales laterales supra e infrangulares. Las papilas marginales e intramarginales mentomianas están bien desarrolladas, son cónicas, con el extremo distal liso y redondeado, la hilera de papilas marginales puede presentar papilas bifidas y trifidas en número variable (fig. 1a, b). El disco sobresale del contorno de la cabeza cuando está relajado. Las papilas intramarginales laterales son cónicas, bajas y simples, pueden presentarse en la región supra o infra-angular en forma aislada o en grupos de hasta cuatro papilas (fig. 1c). Existen cinco pliegues labiales paralelos entre sí, dos anteriores curvos y tres posteriores más cortos y rectos, la fórmula dentaria es  $1 < 1 > / < 1 > 2$ . Sobre el pliegue labial los queratodontes forman una hilera continua y homogénea, el número de queratodontes oscila entre seis y siete cada 100  $\mu\text{m}$ , están formados por una base larga, un cuello corto, angosto y marcado y una espátula levemente cóncava y alargada que presenta en



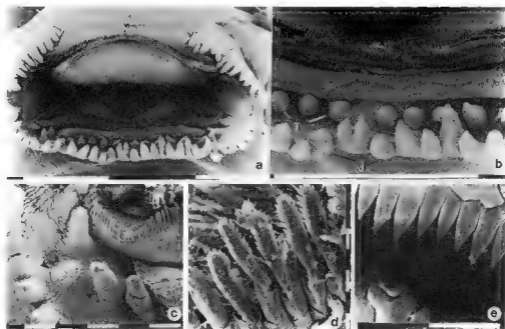


Fig. 1 - (a) Aparato bucal de *Alsodes gargola* Estadio 31 Escala 1mm (b) Detalle de las papilas mentomanas del disco oral, marginales (J) e intramarginales (T), de *Alsodes gargola* Estadio 31 Escala 1 mm (c) Papilas intramarginales infraangulares (flechas) Estadio 30 Escala 0,1 mm (d) Queratodontes de la primera hilera inferior de *Alsodes gargola* Estadio 30 Escala 10  $\mu$ m - (e) Suprarrostradonte de *Alsodes gargola* Estadio 30. Escala 0,1 mm

su borde libre de 14 a 20 denticulos cortos (fig. 1d), la longitud total de los queratodontes se encuentra aproximadamente entre 50 y 60  $\mu$ m; la longitud de la espátula puede variar de 35 a 40  $\mu$ m y su ancho es de aproximadamente 10  $\mu$ m, lo que representa  $\frac{1}{4}$  de la longitud de la misma. En las espátulas de *Alsodes g. neuquensis* se registraron de 18 a 20 denticulos, y en las de *A. g. gargola* se registraron 14 a 18

Los rostradontes son más anchos que altos, están bien desarrollados y fuertemente queratinizados. El infrarrostradonte o pieza inferior tiene forma de "V" y el suprarrostradonte o pieza superior, de arco, el ancho del suprarrostradonte disminuye abruptamente en los extremos laterales, en tanto que el infrarrostradonte mantiene un ancho uniforme y sus extremos son redondeados, las aserraduras son más pronunciadas en la región medial. El número de rostradontes varía entre tres y cuatro cada 100  $\mu$ m; los rostradontes poseen el extremo distal liso y agudo, son siempre más altos que anchos y su longitud total es aproximadamente 75  $\mu$ m (fig. 1e). Los denticulos de los queratodontes y los apices de los rostradontes, cuando emergen, presentan sus cúspides agudas, tornándose romas o redondeadas cuando afloran totalmente de la estructura que los sostiene.

La pigmentación del disco oral es escasa, formada por cúmulos irregulares y aislados de cromatóforos que le otorgan una coloración castaño claro; la mayor pigmentación se presenta en la cara dorsal de las papilas marginales, las papilas intramarginales laterales pueden carecer de pigmentación. Las partes expuestas de las estructuras córneas están intensamente pigmentadas y su color puede variar desde castaño oscuro a negro.

#### DESCRIPCIÓN DE LA CAVIDAD BUCOFARÍNGEA

##### *Piso de la cavidad bucofaringea*

La región prelingual presenta cuatro papilas infralabiales, dos laterales y dos ventrales. El esbozo lingual es redondeado, y sobre él se desarrollan de dos a cuatro papilas linguales, siendo las centrales más altas; las papilas linguales son digitiformes y simples, aunque pueden presentar el extremo distal más delgado o con ramificaciones, la superficie es lisa o verrugosa (fig. 2a b). La arena del piso de la cavidad oral está limitada lateroposteriormente por abundantes y desarrolladas papilas periféricas de forma cónica, que se disponen formando un arco; la superficie de la arena del piso de la cavidad oral está tapizada por papilas bajas, simples y digitiformes y por pústulas. En el área anterior a las hendiduras bucales, se encuentran papilas y un pliegue que está orientado transversalmente a la arena del piso de la boca y dirigido hacia la luz de la cavidad bucofaringea; esta estructura es laminar y presenta de dos a cuatro proyecciones desarrolladas y generalmente digitiformes (fig. 2c). Las hendiduras bucales son alargadas y están ubicadas transversalmente con respecto a la línea media y con el extremo interno dirigido levemente hacia la región anterior de la cavidad oral. El borde posterior libre del velo ventral tiene de tres a cinco proyecciones marginales simples y está interrumpido en la región media por una escotadura mediana, enmarcada por proyecciones desarrolladas que le confieren forma de "V". El borde del velo y sus proyecciones presentan una región glandular angosta con fosetas secretoras redondeadas (fig. 2d-3a).

##### *Techo de la cavidad bucofaringea*

En el centro del área prenarial, se encuentra una papila impar de mediano tamaño. Las narinas internas son prominentes, perforadas, de forma elíptica y con válvulas moderadamente desarrolladas y con borde libre liso; el extremo interno está orientado hacia la región anterior de la cavidad oral. El área postnarial presenta de tres a cinco pares de papilas postnariales de diferente tamaño, estas papilas se disponen a ambos lados del eje longitudinal de la cavidad bucofaringea, siguiendo una línea oblicua con respecto a este eje y con una orientación similar a la de las narinas internas. Los pliegues laterales están bien desarrollados, son laminares y presentan de tres a cuatro proyecciones generalmente digitiformes de diferente longitud. El pliegue mediano tiene forma variable, paredes lisas o verrugosas, y su extremo distal puede ser único o presentar pequeñas proyecciones en número variable (fig. 4a-b). La arena del techo está delimitada posteriormente por papilas bajas y lateralmente por

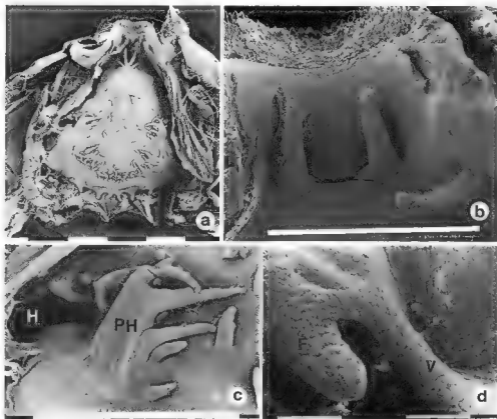


Fig. 2. (a) Piso de la cavidad bucofaringea de *Alzodes gargola* Estadio 31 Escala 1 mm - (b) Tres papilas infralabiales de *Alzodes gargola* Estadio 31 Escala 1 mm - (c) Plegue (PH) anterior a la hendadura bucal izquierda (H), de *Alzodes gargola* Estadio 26 Escala 1mm - (d) Borde (V) y proyección (F) del velo ventral de *Alzodes gargola* Estadio 26. Escala: 0,1 mm

cuatro a cinco papilas marginales bien desarrolladas y generalmente simples. Todas las papilas y las pústulas son cónicas, siendo las más bajas las ubicadas en el área central de la arena del techo (fig. 4a). La región glandular se encuentra en el área posterior a la arena y está dispuesta en una franja ancha con forma de "U" abierta, las fosetas secretoras son redondeadas (fig. 4c). El velo dorsal tiene el borde libre liso y está interrumpido en la línea media (fig. 2b).

Hemos observado escasas variaciones en el número de papilas linguales del piso de la cavidad bucofaringea. En algunos casos y en ambas taxa (*A. gargola gargola* y *A. gargola neuquensis*), en estadios no consecutivos y avanzados, 28, 31 y 37, registramos ejemplares con dos, tres o cuatro papilas linguales. En cuanto al desarrollo de las papilas linguales, en *A.*

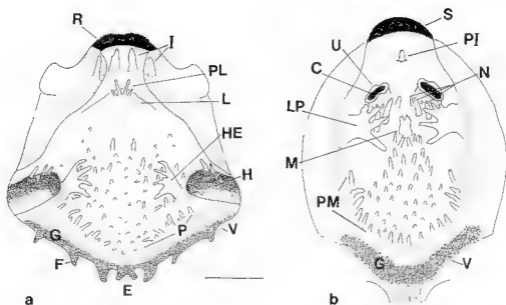


Fig 3. Morfología de la cavidad bucofaringea de la larva de *Alsodes gargola* (estadio 37). (a) piso; (b) techo. C, coana. E, escotadura mediana. F, proyeccion marginal. G, región glandular. H, hendidura bucal. HE, pliegue anterior a la hendidura. I, papila infralabial. L, esbozo lingual. LP, pliegue lateral. M, phlegue mediano. N, papilas postarriales. P, papilas periféricas del área del piso de la cavidad bucofaringea. PI, papila prearrial impar. PL, papilas linguales. PM, papilas del margen del área del techo de la cavidad bucofaringea. R, infrarostrodonte. S, suprarrostródonte. U, válvula de la coana. V, velo. Escala: 2 mm.

*gargola neuquensis*, éstas se observan más largas y delgadas que en *A. gargola gargola* cualquiera sea el estadio considerado.

#### COMENTARIO SOBRE EL CONTENIDO DEL TUBO DIGESTIVO

Los resultados del análisis del contenido muestran que está compuesto por varios ítems alimentarios, principalmente diatomeas perifíticas; entre estas algas los géneros predominantes son *Diatoma*, *Fragilaria*, *Nitzschia* y *Cymbella*. En menor medida, también se encuentran algas Cianofitas y Clorofitas, protozoos ciliados, fragmentos de origen vegetal, hifas de hongos y material orgánico amorfo.

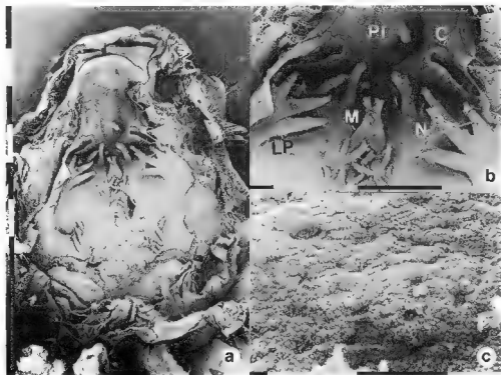


Fig 4 (a) Techo de la cavidad bucofaringea de *Alsodes gargola* Estadio 31 Escala 1 mm - (b) Detalle de papila preanal impar (PI), papilas postanales (N), pliegue mediano (M), coana izquierda (C) y pliegue lateral (LP) Estadio 31 Escala 1 mm - (c) Detalle de region glandular en zona posterior del techo de la cavidad bucal de *A. gargola* Estadio 31. Escala 0,1 mm

#### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El estudio realizado de la morfología oral y bucofaringea de la larva de *Alsodes gargola* pone en evidencia características propias y en común con las otras larvas de telmatobinos del bosque templado patagónico descritas o comentadas por diversos autores (CEI & ROIG, 1965; FORMAS, 1975, 1981; FORMAS & PUGIN, 1978; BUSSE, 1980; VELOSO et al., 1981; LAVILLA, 1983, 1988, DÍAZ PÉREZ, 1984; DÍAZ & VALENCIA, 1985, DÍAZ & NUÑEZ, 1988, BRIEVA VÁSQUEZ, 1988; WASSERSUG & HEYER, 1988; FORMAS et al., 1997). Coincidiendo con la descripción realizada por PILLADO et al. (2000), las larvas de *A. gargola* tienen un aparato bucal generalizado y bien desarrollado, con un disco oral con constricciones angulares. Estas características las comparte con la mayoría de las especies de telmatobinos estudiadas, con excepción de *Telmatobius jelskii* y *Telmatobius marmoratus* (LAVILLA, 1988). Entre los telmatobinos, el género *Alsodes* es el único que posee papilas intramarginales mentonanas. La fórmula dentaria de *A. gargola* (1 <1>/<1>:2) es compartida por la mayoría de los telmato-

binos, excepto el género *Eupsophus* que presenta una reducción en el número de hileras de queratodontes, asociada a una alimentación endotrofica (FORMAS & PUGIN, 1978, FORMAS, 1989a-b, 1992). La fórmula dentaria se caracteriza por presentar una gran constancia en la distribución de las hileras de queratodontes. El número de denticulos en las espátulas de los queratodontes varía entre 14 y 20 unidades. El número es levemente mayor en *A. g neuquensis* (18-20) que en *A. g gargola* (14-18). Consideramos que dichas variaciones en el número de denticulos no resultarían en una diferencia funcional puesto que no afectan la morfología de la espátula. Las leves variaciones morfológicas encontradas en los ápices de los rostrodontes y en los denticulos de los queratodontes estarían asociadas al proceso de crecimiento, desgaste y recambio de los mismos.

La larva de *Alsodes gargola* comparte con otras larvas del género *Alsodes* y las de otros leptodactílidos de los géneros *Caudhverbera*, *Atelognathus*, *Batrachyla*, *Hylorina*, *Pleurodema* y *Odontophrynus* (según BRIEVA VÁSQUEZ, 1988 y WASSERSUG & HEYER, 1988), la presencia de 4 papilas infralabiales. En cuanto a las papilas linguales, se observa una cierta variabilidad en su número, especialmente entre los telmatobinos (2 a 8) incluyendo *A. gargola*; sin embargo, 4 papilas linguales es el número más frecuente entre los leptodactílidos patagónicos (BRIEVA VÁSQUEZ, 1988, WASSERSUG & HEYER, 1988). Las características del techo de la cavidad bucofaringea son coincidentes con *Batrachyla taeniata* en cuanto a la presencia de una papila impar prenarial y al pliegue mediano desarrollado. *Alsodes gargola* comparte con *Batrachyla antartandica*, *B. leptopus* y *B. taeniata* una papilación abundante en las arenas del piso y del techo de la cavidad bucofaringea. Estas características podrían estar más asociadas a una relación de parentesco entre las especies aludidas que a la alimentación y a los microambientes que habitan durante el desarrollo. Las especies de *Batrachyla* se desarrollan en cuerpos de agua lenticos, temporarios (*B. taeniata* y *B. leptopus*) o permanentes (*B. leptopus* y *B. antartandica*) (FORMAS, 1981, SALLABERRY et al., 1981) y la larva de *A. gargola* habita sólo ambientes permanentes tanto loticos como lénticos de altura (ÚBEDA et al., 1998). En estas especies, la tendencia común al desarrollo de largas y robustas papilas a la entrada de la boca podría sugerir una función involucrada con la detección o repulsión de partículas, alimenticias o de otro tipo, que pudieran ingresar con el agua. La distribución y el conspicuo desarrollo de las papilas de las arenas del techo y del piso de la cavidad bucofaringea de la larva de *Alsodes gargola* son características semejantes a otras larvas de leptodactílidos de ambientes loticos de montaña (WASSERSUG & HEYER, 1983, 1988).

Las fosetas secretoras ocupan el borde del velo ventral y una banda posterior en el techo de la cavidad bucofaringea. Estas áreas tienen un escaso desarrollo en relación con las proporciones que la cavidad bucal adquiere, especialmente en la última etapa del desarrollo, en el que la larva puede alcanzar una longitud total de hasta 87 mm (PILLADO et al., 2000). Sin embargo, esta característica parece no tener influencia en la cantidad de sustancia mucosa secretada, puesto que en todos los especímenes examinados, esta sustancia se halla extendida en forma abundante en toda la superficie de la cavidad bucal.

*Alsodes gargola* presenta un periodo prolongado de desarrollo larvario, que supera el año (ÚBEDA et al., 1998). Los ambientes que habita la larva son arroyos de montaña y lagos de altura por encima del límite de vegetación. Los primeros carecen de plancton, mientras que en los segundos la comunidad fitoplanctonica está representada por nanoplancton y una porción substancial de la producción primaria total está a cargo de las algas benticas (epilíton)

(ZAGARESE et al., 2000) La posición del disco oral y la morfología de sus estructuras permiten a la larva de *Alsodes gargola* la recolección del alimento epilítico o perifítico desarrollado sobre diversos sustratos (rocas, vegetación acuática, troncos sumergidos, etc.) Probablemente una exitosa solución para asegurar la recolección de partículas sueltas, ha sido, en el caso de *A. gargola*, aumentar el número, tamaño y densidad de las papilas bucofaríngeas que pudieran seleccionar el tamaño de la partícula ingerida, y por otra parte, aumentar la densidad y el largo de los queratodontes que actuarían como cepillos barriendo las superficies de los sustratos y reumiendo los organismos que sobre ellas se desarrollan, para luego retenerlos en el mucus de la cavidad bucofaríngea. La acción de tales estructuras aseguraría la recolección y selección de partículas, tanto en aguas quietas como en movimiento. Esto conduce a pensar que la conformación del aparato bucal y de la cavidad bucofaríngea de la larva de *A. gargola* le otorga cierta versatilidad que la hace hábil para proveerse de su alimento en el fondo, tanto de partículas sueltas como adheridas a un sustrato.

En cuanto a las escasas variaciones en número de las papilas linguales halladas en algunos estadios avanzados de *A. gargola*, las consideramos como casos individuales, puesto que no reflejan un patrón de desarrollo paulatino, en el cual el número de papilas se podría ir incrementando a medida que transcurre el desarrollo de la cavidad bucal. En los ejemplares de estadios menores (estadios 26 y 27), se registraron cuatro papilas linguales. Considerando además las especies estudiadas por otros autores (BRIEVA VÁSQUEZ, 1988; WASSERSUG & HEYER, 1988; ECHEVERRÍA, 1995), surge que el número de cuatro papilas linguales es el caso más frecuente entre las larvas exotróficas de leptodactílidos, independientemente del ambiente en que se desarrollen y de su grado de afinidad filogenética. Las variaciones morfológicas de las papilas linguales entre *A. g. gargola* y *A. g. neuquensis* podrían atribuirse, fundamentalmente, a factores genéticos. Aunque ambas larvas mantienen un patrón morfológico estable en su cavidad bucal, en *A. g. neuquensis* el conjunto de papilas se observa, en general, más alargadas y delgadas que en *A. g. gargola*. Esta afirmación incluye a las papilas linguales de *A. g. neuquensis*.

## RESUMEN

Se describe la microanatomía del aparato bucal y la cavidad bucofaríngea de la larva de *Alsodes gargola* observada con microscopio electrónico de barrido y microscopio estereoscópico sobre especímenes colectados en las provincias de Neuquén y Río Negro (Argentina). El aparato bucal presenta queratodontes formados por una base larga, cuello corto y espátula multicuspidada, con 14 a 20 denticulos. El pico corneo es más ancho que alto y los rostradontes son unicuspidados con el extremo liso y agudo. La cavidad bucofaríngea tiene dos pares de papilas infralabiales y una papila impar prenarial, papilas y pustulas tanto en el piso como en el techo, pliegues laterales con proyecciones digitiformes de diferente longitud, velo y área glandular en la parte posterior. El esbozo lingual tiene de dos a cuatro papilas y el pliegue mediano puede presentar proyecciones distales. Las variaciones morfológicas de las papilas linguales entre *A. g. gargola* y *A. g. neuquensis* podríamos atribuirles a factores genéticos, sin otorgarles, por el momento, importancia taxonómica. El análisis comparativo realizado sobre la microanatomía de la cavidad bucofaríngea entre *A. gargola* y otras especies

de telmatobinos que habitan el bosque templado patagónico evidencia las similitudes con las larvas de vida libre, especialmente con las del género *Batrachyla*. En el contenido del tubo digestivo se encontraron principalmente diatomeas epíticas y períticas, en concordancia con las adaptaciones anatómicas a una alimentación de fondo.

### AGRADECIMIENTOS

A la Administración de Parques Nacionales de Argentina por autorizar la realización de los muestreos en el Parque y Reserva Nacional Nahuel Huapi; A D Gimenez del Servicio de Microscopia Electrónica de Barrido dependiente del Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas de las Fuerzas Armadas (CITEFA), por la asistencia técnica brindada; A G Baffico por su colaboración en la determinación del contenido del tubo digestivo, a R. Albariño y a M. Weigandt por sus sugerencias metodológicas para la determinación taxonómica de los items tróficos y a F. Pedrozo por facilitar el uso de instrumental óptico (Universidad Nacional del Comahue). Este estudio fue financiado en parte con un subsidio para la investigación otorgado por la Universidad Nacional del Comahue (proyecto 04/B083) y con un subsidio de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) de Argentina (PICT 01-03698)

### LITERATURA CITADA

- BRIEVA VÁSQUEZ, L. M., 1988 - *Análisis morfológico comparativo de las larvas de las especies del género Batrachyla (Anura - Leptodactylidae)*. Tesis Magister, Universidad Austral de Chile, Valdivia 1-116
- BUSSE, K., 1980 - Zur Morphologie und Biologie von *Telmatobius montanus* Lataste 1902, nebst Beschreibung seiner Larve (Amphibia - Leptodactylidae). *Amphibia-Reptilia*, **1**: 113-125
- CEI, J. M., 1976. - Remarks on some neotropical amphibians of the genus *Alysodes* from southern Argentina (Anura Leptodactylidae). *Atti Soc. Ital. Sci. Nat. Museo Civ. Stor. Nat. Milano*, **117** (3-4): 159-164
- CEI, J. M. & ROIG, V. G., 1965 - The systematic status and biology of *Telmatobius montanus* Lataste (Amphibia, Leptodactylidae). *Copeia*, **1965** (4): 421-425
- DEUNEF, J. & BEAUMONT, A., 1959. - Histogénese des dents et du bec corné chez les larves de *Discoglossus pictus* Oth. C. *Soc. Biol.*, **153**: 1162-1164
- DÍAZ, N. F. & NÚÑEZ, H., 1988. - Nuevo hallazgo de *Alysodes verrucosus* (Philippi, 1902) en Chile y descripción de su larva (Anura - Leptodactylidae). *Bol. Mus. Nat. Hist. Nat. Chile*, **41**: 87-94
- DÍAZ, N. F. & VALENCIA, J., 1985 - Larval morphology and phenetic relationships of the Chilean *Alysodes* *Telmatobius candivirbera* and *Insuetophrynus* (Anura - Leptodactylidae). *Copeia*, **1985** (1): 175-181
- DAZ PEREZ, N. F., 1984 - *Biostemática y relaciones filogenéticas de las especies chilenas de Leptodactylidae (Amphibia - Salientia - enfoque multidisciplinario)*. Tesis Doctoral, Fac. Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Univ. Chile: [1-xxxiii] + 1-174
- DUBOIS, A., 1995 - Keratodont formulae in anuran tadpoles: proposals for a standardization. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, **33** (1): 1-XV
- ECHEBERRÍA, D. D., 1995 - Microscopia electrónica de barrido del aparato bucal de la cavidad oral de la larva de *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (Anura, Leptodactylidae). *Alytes*, **12** (4): 159-168
- FERRITO DE LOPEZ, L. E. & ECHEBERRÍA, D. D., 1984 - Morfogenesis de los dientes larvales y pico córneo de *Bufo arcularium* (Anura - Bufonidae). *Rev. Mus. Arg. Cienc. Nat., Bs. As., Zoología*, **13** (60): 573-578



- FORMAS, J. R., 1975 Las larvas de las especies chilenas pertenecientes al genero *Eupsophus*, grupo *nodosus* (Anura, Leptodactylidae) *Bol. Soc. Biol. de Concepcion*, **49**: 231-237.
- 1981 Adaptaciones larvarias de los anuros del bosque temperado austral de Sudamerica *Medio Ambiente*, **5** (1-2): 15-21
- 1989a - A new species of *Eupsophus* (Amphibia Anura: Leptodactylidae) from southern Chile *Proc. Biol. Soc. Washington*, **102** (3): 568-576
- 1989b The tadpole of *Eupsophus calcaratus* in southern Chile. *J. Herp.*, **23** (2): 195-197
- 1992 The tadpole of *Eupsophus vertebralis* (Anura Leptodactylidae). *Herpetologica*, **48** (1): 115-119.
- 1995 Anfíbios. In J. A. SIMONETTI, M. T. K. ARROYO, A. E. SPOTORNO & E. LOZADA (ed.), *Diversidad biológica de Chile*, Comité Nacional de Diversidad Biológica, Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, Santiago, Chile: 314-325
- FORMAS, J. R., CUEVAS, C. & NUÑEZ, J., 1998 A new species of *Alysodes* (Amphibia Anura Leptodactylidae) from southern Chile. *Proc. Biol. Soc. Washington*, **111** (3): 521-530
- FORMAS, J. R. & PUGIN, E., 1978 - Tadpoles of *Eupsophus roseus* and *Bufo variegatus* (Amphibia Anura) in southern Chile. *J. Herp.*, **12** (2): 243-246
- FORMAS, J. R., ÚBEDA, C., CUFVAS, C. & NUÑEZ, J., 1997 *Alysodes australis* a new species of leptodactylid frog from the temperate *Nothofagus* forest of southern Chile and Argentina *Stud. Neotrop. Fauna & Environm.*, **32**, 200-211.
- GALLARDO, J. M., 1970 A new species of the Telmatobinae (Anura, Leptodactylidae) patagónicos *Neotropica*, **16** (50): 73-85.
- GERMAIN, H., 1981 *Flore des diatomées Diatomophycées eaux douces et saumâtres du Massif Armoricain et des contrées voisines d'Europe occidentale*. Paris, Boubée: 1-444
- GOSNER, K. L., 1960 A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, **16**: 183-190.
- LAVILLA, E. O., 1983 *Sistemática de larvas de Telmatobinae (Anura Leptodactylidae)*, Tesis Doctoral, Fac. Ciencias Naturales, Univ. Nac. Tucumán, Tucumán [i-v] + 1-354
- 1988 Lower Telmatobinae (Anura Leptodactylidae) generic diagnoses based on larval characters. *Occ. Pap. Mus. nat. Hist. Univ. Kansas*, **124**: 1-19
- 1992 Tipos portadores de nombre y localidades tipo de anfibios de Argentina *Acta zool. hilloana*, **42** (1): 61-100
- 1994 Comentarios sobre el género *Telmatobates* Diaz, 1989 (Anura Leptodactylidae) *Bol. Asoc. herp. arg.*, **10** (1): 15-18
- MCDIARMID, R. W. & ALFEG, R., 1999 *Tadpoles. The biology of anuran larvae*. Chicago, The University of Chicago Press. [i-xiv] + 1-444.
- PILLADO, M. S., ALONSO, C. A. & ÚBEDA, C. A., 2000 La larva de *Alysodes gargola* Gallardo, 1970 (Leptodactylidae, Telmatobinae). *Alytes*, **18** (1-2): 62-72
- SALLABERRY, M., VALFENCIA, J. & DÍAZ, N., 1981 Distribución y ambientes de *Batrachyla taenata* (Girard) en Chile. *Bol. Mus. nac. Hist. nat. Chile*, **38**: 61-67.
- SMITH, G. M., 1950 *The fresh-water algae of the United States*. New York, McGraw Hill: 1-7-9
- ÚBEDA, C. A., 1998 *Batru. ofauna de los bosques templados patagónicos. Un enfoque exobiogeográfico*. Tesis, Biblioteca Central de Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA: 1-354.
- ÚBEDA, C. A., ALONSO, C. & PILLADO, M. S., 1998 *Alysodes gargola* un anfibio endemico patagónico con adaptaciones a la vida en altura. In *Fauna andino-patagónica aportes a su conocimiento*. Patagonia Silvestre, Serie Técnica, **2**: 1-9.
- VAN DIJK, D. E., 1966 Systematic and field keys to the families, genera and described species of southern African anuran tadpoles. With preliminary inclusion of certain undescribed and inadequately described tadpoles. *Ann. Natal Mus.*, **18** (2): 231-286
- VELOSO, A., DÍAZ, N., ILLERA, P. & PINNA, M., 1981 Descripción de una nueva especie de telmatobino del genero *Alysodes* (Amphibia, Leptodactylidae) de la cordillera de Nahuelbuta (sur de Chile) *Medio Ambiente*, **5** (1-2): 72-77
- VIERTL, B., 1982 The oral cavities of central European anuran larvae (Amphibia). Morphology, ontogenesis and generic diagnosis. *Amphibia-Reptilia*, **4**: 327-360
- WASSERS, G. R., 1980 Internal oral features of larvae from eight anuran families: functional, systematic, evolutionary and ecological considerations. *Univ. Kansas Mus. nat. Hist. Misc. Publ.*, **68**: 1-146

- WASSERSUG, R. J. & HIFYER, W. R., 1983 – Morphological correlates of subaerial existence in leptodactylid tadpoles associated with flowing water. *Can. J. Zool.*, **61**: 761-769
- 1988 – A survey of internal oral features of leptodactyloid larvae (Amphibia Anura). *Smithsonian Contrib. Zool.*, **457**: 1-99
- ZAGARESE, H. E., DIAZ, M., PEDROZO, F. & ÚBELLA, C., 2000 – Mountain lakes in northwestern Patagonia. *Verh. internat. Verein. Limnol.*, **27**: 533-538

*Corresponding editor:* Karen R. LIPS

## **Bacterias coliformes y otras bacterias de interés sanitario en larvas de *Bufo arenarum* Hensel, 1887 (Anura, Bufonidae) en Santa Fe (Argentina)**

Rafael C. LAJMANOVICH, Federico EMILIANI & Paola M. PELTZER

Instituto Nacional de Limnología (INALI, CONICET),  
José Macía 1933, Santo Tomé, Santa Fe (3016), Argentina  
[inali@arctide.edu.ar]

**This study was carried out to give a preliminary, quantitative description of gut bacteria of *Bufo arenarum* tadpoles. The results revealed that bacterial concentrations in larva intestines were higher than bacterial concentrations in water. The number of *Escherichia coli* revealed in the guts of larval *B. arenarum* represented 3 % of thermotolerant coliforms. Taxonomic entities of coliforms were composed by *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. In addition, species of *Vibrio*, *Pseudomonas* and *Aeromonas* were found in these intestines.**

### INTRODUCCIÓN

Como se puede comprobar en la extensa compilación de MACKIE & WHITE (1997a-b), existe abundante información sobre enterobacterias en animales de sangre caliente, pero en mucho menor grado en animales de sangre fría.

Los estudios sobre la microbiología de los anuros se han desarrollado principalmente siguiendo dos líneas. Por un lado, se ha investigado el contenido intestinal (e.g., INGR, 1986; LAJMANOVICH & FERNÁNDEZ, 1995; LAJMANOVICH, 1997) y el rol potencial de los microorganismos en el intestino de las larvas (BJORNDAL, 1997). Por otro lado, otras líneas de estudio han considerado a los anfibios principalmente como reservorios de microorganismos patógenos para otros animales (HIRD et al., 1981, 1983) y para el hombre (TRUST & BARLETTI, 1974; TRUST et al., 1981; RAJENDRAN et al., 1998). Dentro de esta temática, se ha sugerido (GILDRICH & CIARKI, 1966) que la flora bacteriana en estos animales puede reflejar las condiciones bacteriológicas de su ambiente y, por lo tanto, ser un indicador potencial de polución. Esta hipótesis supone que los coliformes fecales no son habitantes normales de su intestino: solamente pasan en forma breve e inalterada por su tracto intestinal. Con respecto a las larvas de anuros, la información bacteriológica existente está limitada a aspectos cualitativos de bacterias de interés sanitario (BJORNDAL, 1997); no se ha encontrado informa-

ción cuantitativa (sobre cualquier tipo de bacterias). Sin embargo, el significado sanitario de las bacterias coliformes no solamente está determinado por la información sobre sus posibles fuentes o reservorios sino, además, por el conocimiento de su distribución cuantitativa (GELDREICH et al., 1964).

Por eso, nuestro objetivo fue realizar una primera descripción cuantitativa de las bacterias de interés sanitario en el intestino de las larvas de *Bufo arenarum*; además, nos propusimos comparar sus concentraciones con las de su medio ambiente para establecer si existe un fenómeno de concentración microbiana. El presente estudio forma parte de un proyecto sobre la distribución de estas bacterias en diferentes organismos acuáticos (peces, almejas, rizósfera de plantas flotantes, etc.).

### MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de agua y de larvas de *Bufo arenarum* se recolectaron en zanjones colectores de aguas pluviales. Estos canales están situados en la periferia de la ciudad de Santo Tome, provincia de Santa Fe, Argentina (31°39'59"S, 60°45'20"O). La vegetación de los márgenes estaba compuesta principalmente por *Alternanthera philoxeroides*, *Cynodon dactylon*, *Bromus* sp. y *Ludwigia* sp.; no se detectó la presencia de peces.

Las muestras de agua para bacteriología se recolectaron en frascos de vidrio estériles (500 ml) y se almacenaron a 3-6°C durante 3 h. antes de los análisis. Por otra parte, se colectaron 125 larvas de *Bufo arenarum* con un copo de nylon, con poros de 2 mm. Las larvas se almacenaron a la misma temperatura, cada larva fue pesada y medida: el peso medio fue de 0.31 g ( $s = 0.06$ ), la longitud promedio (hocico cloaca) de 11.8 mm ( $s = 1.14$ ). El estadio más representativo de desarrollo resultó 37 (de acuerdo a la tabla de GOSNIR, 1960). En la colección Herpetológica del Museo Provincial de Ciencias Naturales Florentino Ameghino (Zoología Vertebrados) de la ciudad de Santa Fe (Argentina) se conserva un lote de referencia de 13 ejemplares (MFA-ZV-H 691) que formaban parte de la cohorte utilizada en este estudio.

Los intestinos fueron macerados en un mortero estéril, se utilizaron 100 g (25.4 % peso seco, relación p/v = 1/25) del macerado para realizar las diluciones destinadas al análisis bacteriológico.

Para el recuento de *Escherichia coli* y coliformes termotolerantes se utilizaron las placas rehidratables "PetriFilm<sup>TM</sup> EC" (de 3M). Las placas se colocaron en bolsas estériles a prueba de agua ("Whirl-Pack<sup>TM</sup>", de Nasco) e incubadas en baño termostático 44.5 ± 0.2°C durante 24 h (EMILIANI & LAJMANOVIC H, 1998). Para la evaluación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) se utilizó el medio "Yeast Peptone agar/25" (FONDEL, 1969). De acuerdo con la división de las bacterias en grupos eco-trofoicos, el medio usado evalúa el número de UFC mesotróficas (EMILIANI, 1984). Las cajas de Petri fueron sembradas por el método de la triple capa (EMILIANI & DUCI, 1985), con cinco repeticiones por cada dilución (1/1000 a 1/1000000) e incubadas a 20°C. Las lecturas se hicieron periódicamente hasta que el número de colonias fue constante (lo que ocurrió en 15 días). El número de Coliformes Totales, *Streptococcus* Fecales y *Pseudomonas aeruginosa* fue determinado por la técnica del número más probable (NMP), según APHA (1989). El número de *Vibrio cholerae*, de acuerdo

con BOCKEMUHL et al. (1986). Además, se seleccionaron cepas de Coliformes Fecales y vibrios para identificarlos bioquímicamente con el sistema "API 20E" (de bioMérieux, Francia) y el programa para computadora de taxonomía numérica "APILAB plus" de la misma empresa (ANÓNIMO, 1998a).

Para estimar si las diferencias entre cada par de recuentos realizados por el método del número más probable (NMP) eran estadísticamente significativas, se utilizó la prueba aconsejada por ORMEROD et al. (1982). La prueba se basa en el error del método y se usa para confirmar o rechazar la hipótesis nula que dos resultados ( $x_1$  y  $x_2$ ) provienen de poblaciones con medias idénticas, para ello se calculó el estadístico  $z = (\log \text{NMP}_1 - \log \text{NMP}_2) / 0.58 \sqrt{n}$ , donde  $n$  = número de repeticiones por dilución. Para estimar si las diferencias entre cada par de recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC) eran estadísticamente significativas, se utilizó el test  $t$  de Student, de acuerdo con PARKINSON et al. (1971). Para determinar la significancia de los estadísticos  $t$  y  $z$  se usó el programa *GraphPad StuMate* (ANÓNIMO, 1998b).

## RESULTADOS

Los resultados (tab. 1) muestran que el número de bacterias, especialmente las del grupo coliforme, es varias veces mayor en los intestinos de las larvas que en su ambiente; aunque las diferencias entre las concentraciones *Streptococcus Fecales* y *V. cholerae*, no resultaron estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ).

El número de Coliformes Totales se aproxima a los valores más altos encontrados en peces por GILDREICH & CLARKE (1966), e inferior al encontrado en los diversos insectos estudiados por GELDRICH et al. (1964). Sin embargo, el número de Coliformes Fecales en las larvas resultó mayor que el encontrado en peces y en insectos. El número de *Streptococcus Fecales*, por lo contrario, resultó menor que los citados para intestinos de peces e insectos.

Además de *Escherichia coli*, las principales especies integrantes del grupo coliforme resultaron ser: *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* (como así también en las muestras de agua). Estas especies también fueron encontradas por HIRD et al. (1983) en larvas de *Rana pipiens*. Además de enterobacterias, en el intestino de las larvas encontramos especies de *Pseudomonas* y de *Vibrio* (al igual que RAJLDRADAN et al., 1998, en *Rana hexadactyla* de la India). Por otra parte, aislamos especies de *Aeromonas salmonicida* y, al igual que otros autores (HIRD et al., 1981 y 1983 en intestinos de larvas de *Rana pipiens*), encontramos *Aeromonas hydrophila*. Esta bacteria fue señalada como posible responsable de la declinación de poblaciones de *Rana pipiens* en algunas regiones de Estados Unidos (GIBBS et al., 1971).

## DISCUSIÓN

Como se sabe (ALLAN & EDIBERG, 1997), *Escherichia coli* es de distribución universal en los intestinos de animales de sangre caliente, con densidades desde  $10^3$  hasta  $10^7$  por gramo, lo cual representa del 90% al 100% del total de coliformes termotolerantes. Si bien las

Tabla 1. - Número de bacterias en el tracto digestivo de larvas de *Bufo arenarum* y en el agua del ambiente. UFC, unidades formadoras de colonias; NMP: número más probable.

	Numero de bacterias			
	Larvas (L)	Agua (A)	L/A	P
Bacterias viables cultivables (UFC/100 ml)	$392 \times 10^8$	$430 \times 10^5$	912	0.0001
Coliformes totales (NMP/100 ml)	$230 \times 10^7$	$80 \times 10^3$	28750	0.0006
Coliformes fecales (UFC/100 ml)	$193 \times 10^6$	$28.7 \times 10^3$	6725	0.0001
Streptococos fecales (NMP/100 ml)	$50 \times 10^3$	$9.0 \times 10^3$	5.5	0.5775
<i>Escherichia coli</i> (UFC/100 ml)	$5.33 \times 10^6$	$3.0 \times 10^3$	1777	0.0001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NMP/100 ml)	$17.5 \times 10^3$	30	583	0.0320
<i>Vibrio cholerae</i> (NMP/100 ml)	400	30	13.3	0.3830

concentraciones de *E. coli* en larvas de *Bufo arenarum* resultaron altas (tab. 1), solamente representaron el 3 % de los Coliformes Fecales. RENNIE et al (1982) y NIEMI (1985) señalaron que los porcentajes de *Klebsiella* y *Enterobacter* son más altos en aguas residuales ricas en carbono y en la rizósfera de las plantas. Dada la amplia relación C/N, estos ambientes resultan favorables para las enterobacterias fijadoras de  $N_2$ . Probablemente, la predominancia de *Klebsiella* y *Enterobacter* (que son especies fijadoras de  $N_2$ ) en el grupo de los Coliformes Fecales, se deba a la misma razón.

No es extraño el hallazgo de especies de *Aeromonas* ni de *Vibrio*, pues tienen una amplia distribución en las aguas naturales, incluso en el zooplancton y en las rizósfera de los camalotes (*Eichhornia crassipes*) (ALONSO et al., 1996; EMILIANI et al., 1997).

La mayor concentración de bacterias en los intestinos de las larvas con respecto a su ambiente puede deberse a que las bacterias se concentran con el alimento ingerido por lo cual habría, al igual que en peces (NIEMI, 1985), una relación entre el número de bacterias en el tracto digestivo de las larvas y el grado de contaminación de los alimentos y del agua. Otra posible razón del mayor recuento en larvas podría ser debido a la multiplicación bacteriana en su intestino, tal como DEL RIO-RODRIGUEZ et al (1997) verificaron en peces, para *E. coli*. Sin embargo, debido a las pocas horas que el alimento permanece en el tracto digestivo de las larvas de anuros (BJØRNDAL, 1996), tal posibilidad es poco probable.

Otra explicación estaría relacionada con una eventual selección o preferencia de las larvas por algún tipo de microorganismo. Esta bien documentado el hecho de que las colonias bacterianas pueden ser quimio-atractivas, repulsivas o neutras para la microfauna (protozoos, cladóceros, nematodos, larvas de insectos, etc.) (RHILINHEIMER, 1994; GRIFFITHS & BARDGETT, 1997), pero no hemos encontrado referencias con respecto a larvas de anuros. Las bacterias en el ambiente acuático pueden estar libres o adheridas (EMILIANI, 1984), en este último caso, forman microcolonias sobre partículas, especialmente sobre algas (RHILINHEIMER, 1994). Es probable que las larvas de anuros realicen una mayor ingesta de bacterias que colonizan partículas (algas o detritus) y que, por lo tanto, se pueda comprobar un mayor número de esas bacterias en su tracto intestinal. En este trabajo, verificamos una significativa

acumulación de enterobacterias (tab. 1,  $P < 0,05$ ); éstas, posiblemente, se encontraban colonizando partículas o formando biofilms (su capacidad de hacerlo es conocida: PACKER et al, 1997). Las demás bacterias, que no se concentraron en forma significativa (tab. 1,  $P > 0,05$ ) en el intestino de las larvas, podrían haber estado en forma de vida libre (fase planctónica). No discriminamos entre bacterias libres y adheridas en las muestras de agua, pero en trabajos anteriores (EMILIANI, 1984), encontramos que la mayor parte de la población bacteriana (61 %,  $V = 38,7$  %) está adherida al seston.

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue brindar una descripción cuantitativa preliminar sobre bacterias intestinales en larvas de *Bufo arenarum*. Los resultados mostraron que el número de bacterias es varias veces mayor en los intestinos de los renacuajos que en su ambiente. El número de *Escherichia coli* en intestinos larvales de *B. arenarum* representó un 3 % de los coliformes termotolerantes. Las entidades taxonómicas de coliformes fueron *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes*. Además, se encontraron especies de *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Aeromonas*.

## AGRADECIMIENTOS

A la Bioq Estella M. González de Páira por su colaboración en los trabajos de laboratorio. A los revisores de la revista *Ahyes* y al editor Dr. Karen R. Lips, por las observaciones, comentarios y sugerencias.

## LITERATURA CITADA

- ANONIMO 1998a. APILAB Plus™ version 3.3.3. Licensed to Federico Emiliani, Serial Number 40408, Lot. 298 090. Copyright© by bioMérieux, Marcy-l'Etoile.
- 1998b. GraphPad StatMate™ version 1.01. Licensed to Federico Emiliani, Serial Number GTA 50533-353. Copyright© by GraphPad Software Inc., San Diego, California.
- ALLIN, M. J. & EDIBERG, S. C. 1997. The public health significance of bacterial indicators in drinking water. In: D. KAY & C. FIRCHER (ed.), *Coliforms and E. coli: problem or solution?* Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 176-188.
- ALONSO, J. L., AMOROS, I. & ALONSO, M. A., 1996. Differential susceptibility of aeromonads and coliforms to ceftiofloxacin. *J. appl. environ. Microbiol.*, **62** (6): 1885-1888.
- APHA. 1989. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 17th ed. Washington, American Public Health Association: 1-874.
- BJORNDAAL, K. A., 1997. Fermentation in reptiles and amphibians. In: R. J. MACKIE & B. A. WHITE (ed.) *Gastrointestinal microbiology*, Vol. 1, *Gastrointestinal ecosystems and fermentations*, New York, Chapman & Hall, 199-230.
- BOCKMUEHL, J., RUCH, K., WOLLERS, B., ALIEMIC, V., ALIEMIC, S. & WOKATSCHEL, R., 1986. Seasonal distribution of facultatively enteropathogenic vibrios (*Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*) in the freshwater of the Elbe River at Hamburg. *J. appl. Bacteriol.*, **60** (3): 435-442.



- DEL RIO RODRIGUEZ, R. E., INGLIS, B. & MILLAR, S. D., 1997 Survival of *Escherichia coli* in the intestine of fish. *Aquacult. Rev.*, **28** (4), 257-264.
- EMILIANI, F., 1984 - Oligotrophic bacteria seasonal fluctuations and correlations with environmental variables (Middle Paraná river, Argentina). *Hydrobiologia*, **111** (1): 31-36
- EMILIANI, F. & DLCE, J. A., 1985 Rehabilitation of the pour plate method for viable counts of freshwater bacteria. *Rev. lat-amer. Microbiol.*, **27** (4), 225-230
- EMILIANI, F., GONZÁLEZ DE PAIRA, S. M. & LAJMANOVICH, R. C., 1997 Frecuencia de aislamiento de *Vibrio cholerae* en aguas y en plancton de la cuenca inferior del Río Salado (Santa Fe, Argentina). *Rev. arg. Microbiol.*, **29** (4): 195-201.
- EMILIANI, F. & LAJMANOVICH, R. C., 1998 Evaluación de las placas "Petrifilm™ E coli" para el recuento de coliformes termotolerantes en aguas recreacionales de Santa Fe (Argentina). *FAB-CIB (Rev. Fac. Biog. Cienc. Biol.)*, **2** (1) 99-105
- FONDEN, R., 1969 - Heterotrophic bacteria in Lake Mälaren and Lake Hjalmarén. *Oikos*, **20** (2) 344-372
- GELDRICH, E. E. & CLARKE, N. A., 1966 Bacterial pollution indicators in the intestinal tract of freshwater fish. *Appl. Microbiol.*, **14** (3), 429-437.
- GELDRICH, E. E., KENNER, B. A. & KABELER, P. W., 1964 Occurrence of coliforms, fecal coliforms, and streptococcus on vegetation and insects. *Appl. Microbiol.*, **12** (1): 63-69
- GIBBS, E. L., NACE, G. W. & EMMONS, M. B., 1971 The live frog is almost dead. *BioScience*, **21** 1027-1034
- GOSNER, K. L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on their identification. *Herpetologica*, **16** (2), 183-190
- GRIFFITHS, B. S. & BARDGETT, R. D., 1997 Interactions between microbe-feeding invertebrates and soil microorganisms. In J. D. LITSAS, J. T. TREVORS & E. M. H. WELLINGTON (ed.). *Modern soil microbiology*, New York, M. Dekker: 165-182.
- HIRD, D. W., DIESCH, S. L., MCKINNELL, R. G., GORHAM, E., MARTIN, F. B., KURTZ, S. W. & DLBROVOLNY, C., 1981 *Aeromonas hydrophila* in wild-caught frogs and tadpoles (*Rana pipiens*) in Minnesota. *Lab. Anim. Sci.*, **31** (2), 166-169.
- HIRD, D. W., DIESCH, S. L., MCKINNELL, R. G., GORHAM, E., MARTIN, F. B., MFADOWS, C. A. & GASTOROWSKI, M., 1983 Enterobacteriaceae and *Aeromonas hydrophila* in Minnesota frogs and tadpoles (*Rana pipiens*). *Appl. environ. Microbiol.*, **46** (6): 1423-1425
- INGER, R. F., 1986 - Diets of tadpoles living in a Bornean rain forest. *Alytes*, **5** (4) 153-164
- LAJMANOVICH, R. C., 1997 Alimentación de larvas de anuros en ambientes temporales del sistema del Río Paraná, Argentina. *Doñana Acta Vertebrata*, **24** (1-2): 191-202
- LAJMANOVICH, R. C. & FERNÁNDEZ, V. C., 1995 Alimentación de larvas de *Bufo arenarum* Hensel, 1867 (Amphibia, Bufonidae) en ambientes del Río Paraná. *Bol. Mus. nat. Hist. Chile*, **45** 7-18
- MACKIL, R. I. & WHITE, B. A., (ed.), 1997a *Gastrointestinal microbiology* Vol 1 *Gastrointestinal ecosystems and fermentations*, New York, Chapman & Hall: 1-660
- 1997b - *Gastrointestinal microbiology* Vol 2 *Gastrointestinal microbes and host interactions* New York, Chapman & Hall: 1-680.
- NIMI, M., 1985 Fecal indicator bacteria at freshwater rainbow trout (*Salmo gairdneri*) farms. *Pub. Water Res. Inst., Helsinki*, **64** 1-50
- ORMLEROD, K., BONDE, G. J. & KRISTENSEN, K. K., 1982 - Bacteriological examination. In M. J. STUESS (ed.), *Examination of water for pollution control. A reference handbook*, Vol 3, *Biological, bacteriological and virological examination*, Oxford, Pergamon Press: 273-461
- PACKER, P. J., HOLT, D. M., COULBOURNE, I. S. & KELVIL, C. W., 1997 Does *Klebsiella oxytoca* grow in the biofilm of water distribution systems? In D. KAY & C. FIRCHER (ed.) *Coliforms and E. coli problem or solution?*, Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 189-194
- PARKINSON, D., GRAY, T. R. & WILLIAMS, S. T., 1971 *Methods for studying the ecology of soil microorganisms*. Oxford, Blackwell, IBP Handbook N°19: 1-116
- RAJENDRAN, P., JAINAMBOO, K. S. M. & THYAGARAJAN, S. P., 1998 A study on the green frog (*Rana hexadactyla*) in relation to the environmental dissemination of enteric human pathogens. *J. environ. Biol.*, **19** (1) 73-78
- RENNIE, R. J., FREITAS, J. R. DE, RUSCHLE, P. & VÖSE, P. B., 1982 Isolation and identification of N-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp.) *Canad. J. Microbiol.*, **28** (5) 462-467
- RHEINHEIMER, G., 1994 *Aquatic microbiology* 4<sup>th</sup> ed. Chichester, J. Wiley & Sons: 1-364



- TRUST, T. J. & BARTLETT, K. H., 1974. - Occurrence of potential pathogens in water containing ornamental fishes. *Appl. Microbiol.*, **28** (1): 35-40.
- TRUST, T. J., BARTLETT, K. H. & LIOR, H., 1981. - Importation of salmonellae with aquarium species. *Can. J. Microbiol.*, **27** (5): 500-504.

*Corresponding editor:* Karen R. LIPS.

## Complete collection of *Alytes*

Entering the new millenium, ISSCA is glad to offer all individuals and institutions who wish so the possibility to receive a free complete collection of back issues of *Alytes*, from volume **1** of 1982 to volume **18** of 2000, just by entering a combined 5-year subscription (2001-2005) to ISSCA, *Circalytes* and *Alytes* (volumes **19** to **23**). The all-in price of the offer, including postage and packing of the 18 volumes of back issues, is 3500 FF or 700 US\$.

Please send your *order* to: ISSCA Secretariat, Laboratoire des Reptiles et Amphibiens, Muséum National d'Histoire Naturelle, 25 rue Cuvier, 75005 Paris, France [e-mail : [ohler@mnhn.fr](mailto:ohler@mnhn.fr); fax: (33).1.40.79.34.88].

Please make your *payment* according to one of the following modes:

– In French Francs, by cheque *drawn on a French bank* payable to "ISSCA", sent to the ISSCA Secretariat (address above).

– In French Francs, by direct postal transfer to our postal account: "ISSCA", Nr. 1-398-91-L, Paris. *If you use this mode of payment, please add 15 FF to your payment for postal charges at our end.*

– In US Dollars, by cheque payable to "ISSCA", sent to: Rafael O. de Sá, Associate Professor, Department of Biology, University of Richmond, Richmond, VA 23173, USA [e-mail: [rdesa@richmond.edu](mailto:rdesa@richmond.edu); fax: (804).289.8233].

If you need an *invoice* before paying, please write to the ISSCA Secretariat (address above).

The set of 18 free volumes of back issues of *Alytes* will be sent to you *after* receipt of your payment.



# ALYTES

International Journal of Batrachology  
published by ISSCA

## EDITORIAL BOARD

*Chief Editor:* Alain DUBOIS (Laboratoire des Reptiles et Amphibiens, Muséum national d'Histoire naturelle, 25 rue Cuvier, 75005 Paris, France).

*Deputy Editor:* Thierry LODÉ (Laboratoire d'Ecologie animale, Université d'Angers, 2 boulevard Lavoisier, 49045 Angers Cedex, France);

*Editorial Board:* Franco ANDREONE (Torino, Italy); Lauren E. BROWN (Normal, USA); Janalee P. CALDWELL (Norman, USA); Ulisses CARAMASCHI (Rio de Janeiro, Brazil); Günter GOLLMANN (Wien, Austria); Tim HALLIDAY (Milton Keynes, United Kingdom); W. Ronald HEYER (Washington, USA); Esteban O. LAVILLA (Tucumán, Argentina); Karen R. LIPS (Canton, USA); Masafumi MATSU (Kyoto, Japan); Donald F. MCALPINE (Saint-John, Canada); John C. POYNTON (London, England).

*Technical Editorial Team* (Paris, France): Alain DUBOIS (texts); Roger BOUR (tables); Annemarie OHLER (figures).  
*Book Review Editor:* Annemarie OHLER (Paris, France).

## SHORT GUIDE FOR AUTHORS

(for more detailed *Instructions to Authors*, see *Alytes*, 1997, **14**: 175-200)

*Alytes* publishes original papers in English, French or Spanish, in any discipline dealing with amphibians. Beside articles and notes reporting results of original research, consideration is given for publication to synthetic review articles, book reviews, comments and replies, and to papers based upon original high quality illustrations (such as colour or black and white photographs), showing beautiful or rare species, interesting behaviours, etc.

The title should be followed by the name(s) and address(es) of the author(s). The text should be typewritten or printed double-spaced on one side of the paper. The manuscript should be organized as follows: English abstract, introduction, material and methods, results, discussion, conclusion, French or Spanish abstract, acknowledgements, literature cited, appendix.

Figures and tables should be mentioned in the text as follows: fig. 4 or tab. 4. Figures should not exceed 16 × 24 cm. The size of the lettering should ensure its legibility after reduction. The legends of figures and tables should be assembled on a separate sheet. Each figure should be numbered using a pencil.

References in the text are to be written in capital letters (BOURRET, 1942; GRAF & POLLS PELAZ, 1989; INGER et al., 1974). References in the *Literature Cited* section should be presented as follows:

BOURRET, R., 1942. — *Les batraciens de l'Indochine*. Hanoi, Institut Océanographique de l'Indochine: i-x + 1-547, pl. 1-4.

GRAF, J.-D. & POLLS PELAZ, M., 1989. — Evolutionary genetics of the *Rana esculenta* complex. In: R. M. DAWLEY & J. P. BOGART (ed.), *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*, Albany, The New York State Museum: 289-302.

INGER, R. F., VORIS, H. K. & VORIS, H. H., 1974. — Genetic variation and population ecology of some Southeast Asian frogs of the genera *Bufo* and *Rana*. *Biochem. Genet.*, **12**: 121-145.

Manuscripts should be submitted **in triplicate** either to Alain DUBOIS (address above) if dealing with amphibian morphology, systematics, biogeography, evolution, genetics, anomalies, pathology or developmental biology, or to Thierry LODÉ (address above) if dealing with amphibian population genetics, ecology, ethology, life history, conservation biology or declining populations. Acceptance for publication will be decided by the editors following review by at least two referees.

If possible, after acceptance, a copy of the final manuscript on a floppy disk (3 ½ or 5 ¼) should be sent to the Chief Editor. We welcome the following formats of text processing: (1) preferably, MS Word (1.1 to 6.0, DOS or Windows), WordPerfect (4.1 to 5.1, DOS or Windows) or WordStar (3.3 to 7.0); (2) less preferably, formatted DOS (ASCII) or DOS-formatted MS Word for the Macintosh (on a 3 ½ high density 1.44 Mo floppy disk only).

Page charges are requested only from authors having institutional support for this purpose. The publication of colour photographs is charged. For each published paper, 25 free reprints are offered by ISSCA to the author(s). Additional reprints may be purchased.



Published with the support of AALRAM  
(Association des Amis du Laboratoire des Reptiles et Amphibiens  
du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France).

*Directeur de la Publication:* Alain DUBOIS.

*Numéro de Commission Paritaire:* 64851.

© ISSCA 2001

Source : MNH-FJ, Paris

## Contents

Charles HOUILLON

- Quatre décennies d'expérimentation embryologique  
chez les Amphibiens Urodèles ..... 97-126

R. BOISTEL & J.-L. AMIET

- Une nouvelle espèce de *Wolterstorffina* (Amphibia, Anura, Bufonidae)  
de l'étage afro-subalpin du Mont Okou (Cameroun) ..... 127-140

Stephen J. RICHARDS & Djoko T. ISKANDAR

- A new species of tree frog (Anura, Hylidae, *Litoria*)  
from the mountains of Irian Jaya, Indonesia ..... 141-152

Lee-Ann HAYEK, W. Ronald HEYER & Claude GASCON

- Frog morphometrics: a cautionary tale ..... 153-177

Mark-Oliver RÖDEL & Raffael ERNST

- Redescription of the tadpole of *Phlyctimantis boulengeri* Perret, 1986  
(Anura, Hyperoliidae) with preliminary comments  
on the biology of the species ..... 178-186

Dinorah D. ECHEVERRÍA, Cecilia A. ALONSO, María Susana PILLADO & Carmen A. ÚBEDA

- Microanatomía del aparato bucal y cavidad bucofaringea de la larva de  
*Alsodes gargola* Gallardo, 1970 (Leptodactylidae, Telmatobiinae) ..... 187-200

Rafael C. LAJMANOVICH, Federico EMILIANI & Paola M. PELTZER

- Bacterias coliformes y otras bacterias de interés sanitario  
en larvas de *Bufo arenarum* Hensel, 1887 (Anura, Bufonidae)  
en Santa Fe (Argentina) ..... 201-207

### Announcement

- Complete collection of *Alytes* ..... 208

*Alytes* is printed on acid-free paper.

*Alytes* is indexed in *Biosis*, *Cambridge Scientific Abstracts*, *Current Awareness in Biological Sciences*, *Pascal*, *Referativny Zhurnal* and *The Zoological Record*.

Imprimerie F. Paillart, Abbeville, France.

Dépôt légal: 1<sup>er</sup> trimestre 2001.